

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT
GEOGRAAFIA OSAKOND

Bakalaureusetöö keskkonnatehnoloogias

**Süntetiliste hõbeda nanoosakeste mõju vankomütsiini
resistentsusgeenide esinemisele ja arvukusele Nõo kombineeritud
tehismärgalapuhasti vertikaalfiltris ja väljavoolus**

Edith Simoniš

Juhendaja: Hiie Nõlvak, PhD

Kaitsmisele lubatud:

Juhendaja:/allkiri, kuupäev/

Osakonna juhataja:/allkiri, kuupäev/

Tartu 2018

Süntetiliste hõbeda nanoosakeste mõju vankomütsiini resistentsusgeenide esinemisele ja arvukusele Nõo kombineeritud tehismärgalapuhasti vertikaalfiltris ja väljavoolus

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli hinnata madala kontsentratsiooniga (0,1 mg/l) süntetiliste hõbeda nanoosakeste ja hõbenitraadi mõju vankomütsiiniresistentsust kodeerivate *vanA*, *vanC*, *vanO* geenide esinemisele ning määrata *vanO* arvukus Nõo tehismärgalapuhasti sisse- ja väljavoolus ning vertikaalfiltri filtermaterjalis. Katsesüsteem koosnes kuuest järjestikku paiknevast vertikaalfiltri ja horisontaalfiltri süsteemist, millest kahele lisati Ag nanoosakesi (0,1 mg/l), kahele $AgNO_3$ (0,1 mg/l) ning kaks ülejäänud olid kontrollsüsteemid.

Katsetulemused osutavad, et nanoosakeste ja hõbenitraadi olemasolu reovees ei oma olulist mõju vankomütsiiniresistentsust kodeerivate *vanA*, *vanC* ja *vanO* geenide esinemisele ja arvukusele tehismärgalapuhasti vertikaalfiltrites. Nõo tehismärgalapuhastis on vankomütsiiniresistentsuse *vanA*, *vanC* geenide esinemine juhuslik ning *vanO* geeni sisaldus suhteliselt madal, kuid siiski jõuab vankomütsiiniresistentsusgeene puhasti väljavooluga vähesel määral looduskeskkonda.

Märksõnad: *tehismärgalapuhasti, süntetilise hõbeda nanoosakesed, hõbenitraat, antibiootikumiresistentsus, vankomütsiin, vanA, vanC, vanO.*

CERCS: T270 Keskkonnatehnoloogia, reostuskontroll.

The effect of synthetic silver nanoparticles on presence and abundance of vancomycin resistance genes *vanA*, *vanC*, *vanO* in microbial community of Nõo constructed wetland vertical flow filters and effluent

The aim of this study was to investigate the impact of synthetic silver nanoparticles and silver nitrate on the presence of vancomycin resistance encoding *vanA*, *vanC*, *vanO* genes and the abundance of *vanO* gene in the influent, effluent and filter material of the vertical flow filters of Nõo constructed wetland. Investigated treatment system consisted of six vertical subsurface flow filters, two of which were treated with synthetic silver nanoparticles (0,1 mg/l), two were treated with $AgNO_3$ (0,1 mg/l) and two were control systems.

The results of the study indicated, that synthetic silver nanoparticles and silver nitrate did not have significant impact on the presence of *vanA*, *vanC*, *vanO* genes, nor on *vanO* gene abundances. In Nõo constructed wetland the *vanA* and *vanC* genes existence is sporadic and *vanO* gene abundance is relatively low. However, Nõo constructed wetland can still be

considered as a reservoir and dissemination node of vancomycin resistance genes from where relatively small concentrations of van genes are dispersed into the environment.

Keywords: *Constructed wetland, synthetic silver nanoparticles, silver nitrate, antibiotic resistance, vancomycin, vanA, vanC, vanO.*

CERCS: T270 Environmental technology, pollution control.

Sisukord

Sisukord	3
Kasutatud lühendid.....	5
Sissejuhatus	6
1. Kirjanduse ülevaade.....	7
1.1 Nanoosakesed, nende kasutamine ja levik keskkonnas	7
1.1.1 Nanoosakesed reoveepuhastuses	8
1.2 Antibiootikumid ja antibiootikumiresistentsus	10
1.2.1 Antibiootikumid	10
1.2.2 Antibiootikumiresistentsus	11
1.2.3 Antibiootikumijäägid ja antibiootikumiresistentsus reoveepuhastuses	13
1.2.4 Vankomütsiin	14
1.2.5 Vankomütsiini resistentsus	15
1.3 Tehismärgalapuhastid.....	16
1.3.1 Tehismärgalapuhastite tüübid	17
2. Materjal ja meetodika.....	20
2.1 Katsesüsteemi kirjeldus.....	20
2.2 Proovide kogumine	21
2.3 DNA eraldamine	21
2.4 Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon.....	22
2.4.1 QPCR üldtingimused.....	22
2.4.2 <i>VanA</i> , <i>vanC</i> ja <i>vanO</i> geenispetsiifiliste praimerite reaktsioonitingimuste optimeerimine ja määramispiiri leidmine.....	22
2.4.3 <i>VanO</i> standard	24
2.4.4 Proovide amplifikatsioon ja andmeanalüüs.....	24
2.5 Statistiline analüüs	25
3. Tulemused	27
3.1 <i>VanA</i> , <i>vanC</i> , <i>vanO</i> qPCR programmide optimeerimine	27
3.2 Vankomütsiini resistentsusgeenide <i>vanA</i> , <i>vanC</i> ja <i>vanO</i> esinemine Nõo tehismärgalapuhasti vertikaalfiltri sissevoolus, filtermaterjalis ja väljavoolus	27
3.2.1 Vankomütsiini resistentsusgeenide esinemine VFsse sissevoolavas reovees.....	28
3.2.2 Vankomütsiini resistentsusgeenide esinemine VF filtermaterjalis	28
3.2.3 Vankomütsiini resistentsusgeenide esinemine VFst väljavoolavas vees	29

Arutelu ja järeldused	31
Kokkuvõte	33
Summary	34
Tänuavaldused	36
Kasutatud kirjandus.....	37
Lisad	44

Kasutatud lühendid

16S rRNA – prokarüootide ribosoomi väikeses alaühikus sisalduv ribosomaalne RNA

ANOVA – dispersioonianalüüs (*Analysis Of Variance*)

AR – antibiootikumiresistentsus

ARB – antibiootikumiresistentsed bakterid

ARG – antibiootikumi resistentsusgeen

DNA – desoksüribonukleiinhape, päriliku informatsiooni kandja

DPD – päevadoos 1000 inimese kohta ööpäevas

FWS – ava- ehk vabaveeline tehismärgala (*free water surface*)

HF – horisontaalvooluline pinnasfilter

KA – kuivaine

LOQ – määramispiir (*limit of quantification*)

MRSA – glükopeptiidi- ja metitsilliiniresistentne patogeen *Staphylococcus aureus*

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon (*Polymerase Chain Reaction*)

qPCR – kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (*Quantitative PCR*)

SSF – vertikaalvooluline tehismärgala (*subsurface flow*)

T-test – Studenti t-test, matemaatilise statistika test

VF – vertikaalvooluline pinnasfilter

VRE – vankomütsiiniresistentne enterokokk

VRSA – vankomütsiiniresistentne *Staphylococcus aureus*

Sissejuhatus

Antibiootikumid on bioaktiivsed ained, mida kasutatakse inimesete ja loomade haiguste ennetamiseks, takistamiseks ja ravimiseks, samuti loomade kasvu edendamiseks (Inyinbor et al. 2018). Antibiootikumide kättesaadavus ning madal hind on soodustanud nende laialdast ning sageli ülemäära kasutamist (Fernandes & Martens, 2017), mistõttu jõuavad antibiootikumide jäägid looduskeskkonda ning soodustavad seal antibiootikumiresistentsuse teket ning levikut. Antibiootikumiresistentsusest on välja kujunenud ülemaailmne probleem, mis ohustab potentsiaalselt inimeste ja loomade tervist (Chaudhary 2016).

Vankomütsiin on glükopeptiidide rühma kuuluv antibiootikum, millel on efektiivne bakteritsiidne toime Gram-positiivsete bakterite ning penitsiliinresistentsete enterokokkide suhtes (Ranotkar et al. 2014). Vankomütsiini resistentsusgeenide (nt *vanA* ja *vanB*) esinemine ja levik kliinilistes keskkondades on võrdlemisi hästi tuntud probleem, kuid vankomütsiini resistentsusgeenide levikut nt reoveepuhastuses ning looduskeskkonnas on uuritud märgatavalt vähem.

Nanohõbeda rohke kasutamine kosmeetikas, majapidamistarvetes, riidesemetes ning tehnoloogias põhjustab nende levimist mulda, setetesse, vette, reoveepuhastusjaamadesse või muudesse puhastusseadmetesse. Reoveepuhastus ei eemalda täielikult veest kõiki patogeene ja resistentsid baktereid, (sealhulgas näiteks vankomütsiiniresistentset *E. faeciumi* (Oravcova et al. 2017)) ega nanoosakesi. Seetõttu on väga tähtis uurida, mis mõju on nanoosakestel tehismärgalas elavatele mikroobikooslustele ning nende poolt läbiviidavatele protsessidele.

Käesoleva töö eesmärgiks on optimeerida vankomütsiiniresistentsust kodeerivate *vanA*, *vanC* ja *vanO* esinemise ja arvukuse määramise meetodika ning seda kasutades hinnata sünteetiliste hõbeda nanoosakeste mõju Nõo kombineeritud tehismärgalapuhasti vertikaalvoolulise pinnafiltris ja selle väljavoolus *vanA*, *vanC* ja *vanO* esinemisele ja *vanO* ning kogu bakterikoosluse arvukusele.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Nanoosakesed, nende kasutamine ja levik keskkonnas

Nanoosake on sfäärilise, torukujulise või ebakorrapärase kujuga osake, mis jääb suurusvahemikku 1-100 nm (Grillo et al. 2015; Wong et al. 2017). Võrreldes muude osakestega on nanoosakestel suur eripind, paremad optilised omadused, tugevam keemiline ja bioloogiline reaktiivsus ning sidumisvõime (Brar et al. 2010; Vale et al. 2016).

Nanoosakesed jagunevad kaheks: looduslikud, ehk õhus lenduvad ultrapeened osakesed (nt tolm, tahm, vulkaaniline tuhk, metsatulekahju suits) või kolloidid pinnases ja veekeskkonnas (Klaine et al. 2008), ning antropogeensed ehk sihtotstarbeliselt sünteetitud nanoosakesed. Sünteetiliste nanoosakeste tootmiseks kasutatakse erinevaid alusmaterjale: metalle (nt Ag, Zn, Au, Ni, Fe, Cu), metallioksiide (nt TiO_2 , Fe_3O_2 , Al_2O_3), mittemetalle (nt SiO_2), süsinikku sisaldavaid ühendeid (nt fullereen), polümeere (nt kitosaan, alginaat, hüdroksümetüülselluloos) ja lipiide (nt steariinhape) (Grillo et al. 2015; Wong et al. 2017).

Nanoosakestel on väga lai kasutusala. Paljud sünteetilised nanoosakesed on välja töötatud kasutamiseks meditsiini valdkonnas (nt diagnostika, nanobiosensorid, luuproteesid, haavaravi, hambaravi, vähi immunsusravi), samuti põllumajanduses, kus tänu nanoosakestele kasvab taime kultiveerimis-produktiivsus ja -tõhusus (Grillo et al. 2015; Smolkova et al. 2017). Üha rohkem on nanoosakesed leidnud kasutust energeetikas, katalüsaatorites, täite- ja katematerjalides, mikroelektroonikas, ilutoodetes ning farmaatsias (Lippmaa & Kahru, 2010).

Tänu antimikroobsetele, optilistele, katalüütilistele ja desinfitseerivatele omadustele on sünteetilised nanohõbeda osakesed kõige sagedamini kasutatavad nanopartiklid tööstuses (Pandey & Prajapati, 2018). Nanohõbe on kõige levinum nanomaterjal maailmas, seda toodetakse kuni 500 tonni aastas (Yang et al. 2017). Nanohõbedat leidub paljudes tarbekaupades nagu kosmeetika (nt kehahooldustooted, hambapasta, šampoon), riideesemed (nt hõbeniidiga sokid), majapidamistarbed (nt kodumasinad), toiduaine pakendid ja värvid. Lisaks sellele kasutatakse neid veepuhastusseadmetes, õhuniisutajates, ravimite ja geeniülekandesüsteemides ning molekulaartehnoloogias (Lippmaa & Kahru, 2010; Sheng & Liu, 2016; Pandey & Prajapati, 2018).

Keskkonda satuvad nanoosakesed looduslikest allikatest nagu atmosfääri aerosoolid (nt õhku pihustunud soolane ookeani vesi), metsatulekahjud (nt tahm ja tolm), geoloogilised protsessid (nt vulkaanipurse, savimineraal allopaan, looduslik leostumine) või

inimtekkelistest allikatest nagu prügilad (nt vanade elektroonikaseadmete koostisosad), tehased (nt süsinikku sisaldavate ainete mittetäielikul põlemisel eralduvad osakesed), reoveepuhastid (nt reoveesete), nanoosakesi sisaldavate toodete kasutamine (Nowack & Bucheli, 2007; Jiang et al. 2017). Nanoosakesed levivad nii õhus, vees kui ka pinnases ning nende tootmine, transportimine, kasutamine ja utiliseerimine soodustab osakeste jõudmist keskkonda, kus need on suhteliselt püsivad (Guo et al. 2017; Jiang et al. 2017). Selliste osakeste sisenemine veekeskkonda ja maismaa ökosüsteemidesse võib mõjutada biootilisi ja abiootilisi protsesse keskkonnas (Schaumann et al. 2015). Näiteks veekeskkonnas on oluliseks mõjutajaks looduslik orgaaniline aine, mis määrab nanoosakeste edasist kulgu ja liikuvust vees, mõjutades osakeste füüsikalisi-keemilisi omadusi (Guo et al. 2017).

Eriti nanohõbeda kasutamine suurendab oluliselt keskkonna saastumise võimalust ning sellest tulenevaid kahjulikke mõjusid (Schlich et al. 2013). Nanohõbeda osakesed võivad keskkonnas agregeeruda või läbi viia aglomeratsiooni ning reageerida vesikeskkonnas (McGillicuddy et al. 2017). Nanohõbe võib sattuda veekeskkonda reo- ja heitvee kaudu (Fijalkowski et al. 2017; Jiang et al. 2017; McGillicuddy et al. 2017). Nanohõbeda toksilisust mõjutavad märkimisväärselt erinevad keskkonnatingimused ning teiste osakeste koostisosad (Guo et al. 2017). Mitmed uuringud on näidanud, et nanohõbe võib avaldada negatiivset mõju veeorganismide erinevatele troofilistele tasemetele (nt bakterid, vetikad, makrofüüdid, selgrootud, kalad) (Jiang et al. 2017).

Hinnanguliselt tarbiti 2014. aastal 225 060 tonni nanoosakesi (Vale et al. 2016). 2016. aastaks kasvas nanoosakeste kasutamine 308 322 tonnile, aastaks 2021 prognoositakse tootmise kasvu 733 220 tonnile aastas (BccResearch 2017). Sellest saab järeldada, et nanoosakeste kontsentratsioon keskkonnas aastatega kasvab, mistõttu on oluline uurida nende mõju keskkonnale. Hõbeda nanoosakeste keskkonnariskide hindamine ja prognoosimine on endiselt raskendatud, kuna osakesed levivad väga kiiresti eri keskkondades ning kahjulik mõju organismidele on erinev (Zhang et al. 2018).

1.1.1 Nanoosakesed reoveepuhastuses

Laialdase nanotehnoloogia produktide kasutamise tõttu jõuavad nanoosakesed tööstusliku või olmereoveega reoveepuhastusjaamadesse või väiksematesse lokaalsetesse puhastusseadmetesse (nt nanohõbedaga kaetud pesumasina hallveega) ning sealt võivad nanoosakesed kanduda edasi keskkonda (nt puhasti väljavoolu kaudu, väetisena kasutatava aktiivmudaga) (Schlich et al. 2013; Fijalkowski et al. 2017).

Aktiivmuda ehk suspenseerunud mikroobset agregaati kasutatakse reovee puhastamisel, et eemaldada veest orgaanilisi ühendeid ning toitaineid (nt fosfor, lämmastik) metaboolsete reaktsioonide kaudu mikroorganismide vahendusel. Aktiivmuda koosneb mikroorganismidest, rakuvälistest biopolümeeridest, orgaanilistest- ja anorgaanilistest ühenditest. Nanoosakesed avaldavad kahjulikku mõju mikroorganismide aktiivsusele aktiivmudas, kuna on kavandatud inhibeerima või takistama bioloogilist aktiivsust (nanoosakeste antibakteriaalne toime). Sattudes reoveepuhastusjaamadesse alandavad nanoosakesed oluliselt reovee puhastusefektiivsust (Sun et al. 2013). Lisaks sellele on võimalik kasutada alternatiivseid reoveepuhastuse meetodeid, mis põhinevad mikroobide biokile võimekusel vett saasteainetest puhastada (nt tehismärgalad, pinnasfiltrid, membraanfiltrid). Biokile on nanohõbeda suhtes väga vastupidav. Näiteks biokilereaktorites on mikroorganismid vähemtundlikud nanohõbeda suhtes kui hõljum, kuna biokile tagab mikroorganismide rakkudele parema kaitse (Sheng & Liu, 2016; Zhang et al. 2016). Heitvee nanohõbeda kontsentratsioon kuni 200 mg/L ei mõjuta oluliselt biokiles olevaid mikroorganisme (Sheng & Liu 2017). Samuti on näidanud, et tehismärgalapuhastid eemaldavad sünteetilisi hõbeda nanoosakesi hästi, puhastusefektiivsusega kuni 85 % (Huang et al. 2017). Tehismärgalades eemaldatakse saasteained füüsikaliste, keemiliste ja bioloogiliste protsesside käigus. Ühelt poolt võivad nanoosakesed bioloogilise puhastamise käigus adsorbeeruda substraadile või taimede pinnale ning seetõttu olla kergesti reoveest eemaldatavad. Teiselt poolt on aga nanoosakesed võimelised inhibeerima taimede ja mikroorganismide elutegevust, mistõttu reovee puhastusefektiivsus võib langeda (Huang et al. 2017).

Nanohõbe omab tugevat antimikroobset toimet (Zhang et al. 2016). Hõbeda ioonid ja hõbedat sisaldavad tooted on mikroorganismidele toksilised. Nanohõbeda kontsentratsioon 1 mg/l võib pärssida rohkem kui 80% autotroofsete nitrifitseerivate mikroorganismide kasvu (Sun et al. 2013; Fijalkowski et al. 2017). Hinnanguliselt üle 90% nanohõbedat ja peaaegu 100% hõbeda ioone adsorbeerub reovee setetes. Reoveesete on reovee käitlemise protsessi käigus tekkinud tahke või pooltahke jääk ehk kõrvalprodukt (Fijalkowski et al. 2017). Primaarse ja sekundaarse puhastusprotsessi käigus eemaldatakse reoveest >90% nanohõbedat. Protsessi efektiivsus sõltub nanoosakeste keemilis-füüsikalistest omadustest (nt osakeste suurus ja –kontsentratsioon), reovee omadustest ja olemusest (nt temperatuur, pH, lahustunud hapniku tase, ligandide olemasolu) ning viibeajast puhastussüsteemis (Brar et al. 2010; Fijalkowski et al. 2017; McGillicuddy et al. 2017).

Tihti peale sisaldab reoveesete ohtlikke ühendeid (nt toksilised ained Ag, Se, Ti; nanoosakesed; polüaromaatsed süsivesinikud; pindaktiivsed ained), mis mõjuvad negatiivselt inimese tervisele ja ökosüsteemile. Seetõttu on arenenud riikides pööratud erilist tähelepanu reoveesetete puhastustehnoloogia kvaliteedi parandamisele (Fijalkowski et al. 2017).

1.2 Antibiootikumid ja antibiootikumiresistentsus

1.2.1 Antibiootikumid

Antibiootikumid on looduslikud (elusorganismide poolt produtseeritud) või tööstuslikult sünteesitud kemoterapeutilised ained, mis mõjuvad mikroorganismide (bakterid, seened, viirused, algloomad) kasvule pärssivalt või surmavad neid (Kümmerer 2009; Ding & He, 2010). Antibiootikumid on mitmekesine kemikaalide rühm, mida grupeeritakse enamasti kas keemilise struktuuri [nt glükopeptiidid (vankomütsiin), beeta-laktaamid (penitsilliin), tetratsükliinid (doksütsükliin)] või toimemehhanismi [nt rakukesta sünteesi (vankomütsiin), valgusünteesi (tetratsükliinid) ja nukleiinhapete sünteesi (tsiprofloksatsiin)] takistavad ained ning mikroobide metabolismi pärssivad ained (sulfoonamiidid), tsütoplasma membraani omadusi muutvad ained (polümüksiinid)] alusel (Kümmerer 2009; Ding & He, 2010; Grenni et al. 2018).

Antibiootikumide ajastu sai alguse 1928. aastal, kui inglise bakterioloog Alexander Fleming avastas penitsilliini (Yilmaz & Özcengiz, 2017). Alatest sellest ajast on antibiootikumid muutunud tervishoiuvaldkonnas väga olulisteks mikroobide tekitatud infektsioonide ennetamiseks, takistamiseks ja ravimiseks kasutatavaks ravimiklassiks (Page et al. 2017; Shi et al. 2018). Kõige enam tarbitakse β -laktamantibiootikume, näiteks penitsilliini ja tsefalosporiini, seevastu makroliidide, sulfoonamiidide ja fluorokinoloonide manustamine kahaneb (Kümmerer 2009). Lisaks sellele on antibiootikumid leidnud laialdast kasutust kari- ja koduloomade veterinaarravimites, vesiviljeluses, loomade ja kodulindude kasvatuses, söödalisandites ja kasvustimulaatorites (suurendades valgu ja vähendades rasva sisaldust lihas) (Sharma et al. 2016; Page et al. 2017; Kumar & Pal, 2018). Alatest 1950. aastast kasutatakse antibiootikume ka taimekasvatuses, puu- ja juurviljade ning dekoratiivtaimede kahjurite tõrjeks (Kümmerer 2009).

Maailmas tarbitakse hinnanguliselt 0,1-0,2 miljonit tonni antibiootikume aastas (Kumar & Pal, 2018). Riigiti on spetsiifiliste antibiootikumirühmade tarbimise praktika väga erinev, näiteks USAs kasutatakse vankomütsiini massiliselt, samas Saksamaal kasutatakse seda vaid

juhul, kui kõik muud ravimid on resistentsuse tõttu ebaefektiivsed (Kümmerer 2009). Viimase 20 aasta vältel on Eestis olnud antibiootikumide kogukasutus stabiilne (lisa 1) ning Euroopas üks väiksemaid (20 aastat ravimistatistikat Eestis, 2015) Vankomütsiini kasutamine on Eestis tõusuteel, alatest 2014. aastast on manustamine Eestis kasvanud 0,01 DPDlt (päevadoos 1000 inimese kohta ööpäevas) 0,02 DPDle (Raviameti statistika aastaraamat, 2017).

Antibiootikumide levik keskkonda on viimastel aastakümnetel kogu maailmas kasvanud (Carvalho & Santos, 2016). Nagu paljud teised ravimidki satuvad antibiootikumid ökosüsteemidesse inimeste ja loomade uriini ja väljaheidete (reoveepuhastusjaamadest) ning ravimite tootmis- ja käitlemisprotsesside kaudu (Page et al. 2017). Samuti on täheldatud antibiootikumijääkide levikut mulda sõnniku ning niisustusvee kaudu (Grenni et al. 2018). Antibiootikumid ja nende jäägid võivad keskkonnas muunduda, bioakumuleeruda, koguneda pinna- ja põhjavette ning sadestuda pinnasesse (Carvalho & Santos, 2016). Antibiootikumide kontsentratsioon looduslikes keskkondades (nt muld, pinnas, vesi) ulatub mõnest nanogrammist kuni sadade nanogrammideni ühe liitri vee või kg pinnase kohta. Kõige suuremad kontsentratsioonid on enamasti piirkondades, kus on tugev antropogeenne mõju, näiteks haiglate reovesi, reoveepuhastusjaamad ning põllumaa, mida on väetatud sõnnikuga (Grenni et al. 2018). Sõltuvalt pinnasest ning antibiootikumide omadustest võivad ravimijäägid levida sügavatesse pinnakihtidesse ja põhjavette (Grenni et al. 2018). Keskkonda jõudvate antibiootikumijääkide hulk korreleerub sesoonse tarbimise hulgaga, olles talvel kõrgem. Antibiootikumide jääkkontsentratsioon ei tulene ainult nende pidevast kasutamisest vaid ka antibiootikumide püsivusest. Fluorokinoloonid, makroliidid ning tetratsükliinid on püsivad, need levivad keskkonnas ulatuslikult ning akumulereuvad kõrgemates kontsentratsioonides. Mõned antibiootikumid, näiteks penitsilliinid, on aga kergesti lagundatavad (Grenni et al. 2018).

1.2.2 Antibiootikumiresistentsus

Antibiootikumiresistentsus (AR) on looduslik nähtus, mis on eksisteerinud miljoneid aastaid ja hõlmab bakterite vastupidavust ühe või mitme antibiootikumi toimele (Friedman et al. 2016; Kumar & Pal, 2018). AR võib olla loomulik ehk kaasasündinud või omandatud (MacGowan & Macnaughton, 2017). Loomulik resistentsus on mikroorganismi omadus, mis on tingitud mikroobi rakumembraani läbimatuses antibiootikumile või ründepunkti puudumisega (Mikelsaar et al. 2006). Näiteks kõikidel Gram-positiivsetel mikroorganismidel

on sünnijärgne resistentsus kolistiini vastu ning enterobakteritele on omane vastupanu linesoliinidele ja glükopeptiididele. Omandatud resistentsus esineb bakteritel, kellel on resistentsuse mehhanismi kodeerivad geenid spontaanselt muteerunud või on toimunud geneetilise materjali horisontaalne ülekanne teistelt bakteritelt (MacGowan & Macnaughton, 2017). Peamiselt tekib AR kolme mehhanismi kaudu: geneetiline mutatsioon, horisontaalne geeniülekanne ja rekombinatsioon koos antimikroobsete ühendite selektiivse survega (Berendonk et al. 2015). Arvutuslikult kõige sagedasem ARe levimistüüp on siiski otsene pärandumine järglasorganismidele (Ranotkar et al. 2014). AR on vältimatu bioloogilise evolutsiooni nähtus (Sharma et al. 2016).

Mitmesugused uuringud, analüüsid ning epidemioloogilised andmed tõendavad, et resistentsete organismide levik on viimase 50 aasta jooksul drastiliselt suurenenud (Friedman et al. 2016). ARe uurimine keskendub peamiselt patogeenidele (Karkman et al. 2018). Kõige tuntum antibiootikumide suhtes vastupidav patogeen on glükopeptiidi- ja metitsilliiniresistentne *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Rather et al. 2017).

Bakterid omavad märkimisväärselt antibiootikumide biosünteesi ja resistentsust määravaid geene (Friedman et al. 2016). Antibiootikumiresistentseid geene (ARG) ja –baktereid (ARB) on avastatud erinevatest keskkondadest, näiteks setetest, järvedest, jõgedest, merekeskkonnast, mullast, reovee puhastusjaamadest, kanalisatsioonist ning olmejäätmete käitluskohtadest (Sharma et al. 2016; Gao et al. 2018). Antibiootikumide laialdane kasutamine põhjustab lisaks keemilisele saastumisele ka ARBte ja ARGde levikut, mis kujutab endast tõsist ohtu inimese ja loomade tervisele (Bouki et al. 2013; Inyinbor et al. 2018). Igal aastal põhjustavad ravimiresistentsete bakterite infektsioonid surmajuhtumeid, näiteks on 2015 aasta jooksul registreeritud USAs 23 000, Euroopas 25 000 ja Indias 58 000 surma (Chaudhary 2016). ARGd levivad bakterite seas, samuti kanduvad need inimestelt ja loomadelt looduskeskkonda ning joogivee varudesse (Sharma et al. 2016).

Bakteritel on antibiootikumide toime vastu välja arenenud mitmeid vastupanusüsteeme, mida kodeerivad ARGd (Kumar & Pal, 2018). Resistentsust kodeerivad geenid omavad erinevaid mõjumehhanisme: antibiootikumi inaktiveerivate ensüümide produktsioon, rakumembraani läbilaskvuse vähenemine, antibiootikumi aktiivse rakust väljapumpamise soodustamine (*efflux pumps*), antibiootikumi ründepunktide modifikatsioon ja ründepunktiensüümide modifitseerimine (Mikelsaar et al. 2006). Lisaks sellele on võimalik ka multiresistentsus, mis on defineeritud kui mikroorganismi resistentsus kolme või enama erinevasse antibiootikumide rühma kuuluva ravimi suhtes (Mikelsaar et al. 2006). See nähtus võib olla

tingitud resistentsuse mehhanismide samaaegsest esinemisest ühes mikroorganismis (Mikelsaar et al. 2006).

1.2.3 Antibiootikumijäägid ja antibiootikumiresistentsus reoveepuhastuses

Mitmed uuringud on täheldanud antibiootikumide ja ARGde olemasolu reoveepuhastusjaamades (Kumar & Pal, 2018). Antibiootikumid, ARBd ja ARGd satuvad reoveepuhastusjaama haigla-, hooldekodu-, põllumajanduse- ning olmereovee kaudu (Inyinbor et al. 2018). Antibiootikumide suurenev kontsentratsioon reoveepuhastusjaamades soodustab resistentsete tüvede levikut keskkonda, mis omakorda võib mõjutada negatiivselt nii vee- kui ka maismaaorganisme (Kumar & Pal, 2018).

Ainult murdosa kasutatud farmaatsiatooteid, sealhulgas antibiootikume, metaboliseeritakse organismis ja suur osa lähteühendeid ning nende metaboliite (20-97%) erituvad uriini ja väljaheidete kaudu reovette, kus need jõuavad reoveepuhastitesse (Kümmerer 2009; Auguet et al. 2017). Reoveepuhastis elimineeritakse antibiootikume osaliselt, mistõttu mõned neist jõuavad heitvee kaudu looduslikku veekeskkonda (Kumar & Pal, 2018). Reoveepuhastusjaamad on põhilised antibiootikumiresistentsete tüvede levitajad, kuna sealsed tingimused on soodsad ARBde ja ARGde levikuks (Bouki et al. 2013; Karkman et al. 2018). Töötlemata reovee ja –setete kasutamine põllumajanduses soodustab mulla küllastumist antibiootikumijääkidega ja ARGga (Lüneberg et al. 2018). Samuti heitvee taaskasutamine (nt põllumajanduses) põhjustab palju tervise- ja keskkonnariske (Kumar & Pal, 2018).

Antibiootikumijääkide poolt põhjustatud reostus soodustab patogeensete mikroorganismide arengut, omandades suuremat vastupanuvõimet ravimite suhtes. Resistentsete tüvede levik looduslikes ökosüsteemides võib muuta bakterikoosluste populatsiooni dünaamikat ning talitlust (Bouki et al. 2013). Antibiootikumid võivad mõjutada mikroobikooslust kanalisatsioonis ning reoveepuhastis, mistõttu häirub ka orgaanilise aine lagundamine puhastis (Kümmerer 2009). Kanalisatsioonitorude pinnad aitavad kaasa mikroorganismide koloniseerimisele moodustades biofilmi. Need biofilmid koosnevad mitmekesistest mikroobikooslustest, mis puutuvad pidevalt kokku antibiootikumijääkidega ning soodustavad antibiootikumiresistentsete tüvede teket (Auguet et al. 2017). Põhieeldus horisontaalseks geeniulekandeks on asjaolu, reoveepuhastis on suur bakterite arvukus ning kõrge toitainete sisaldus, mis võimaldab patogeenidel ja reoveepuhasti bakteritel koos eksisteerida. Samuti soodustab horisontaalset geeniulekannet kõrge biotsiidide,

farmaatsiatoodete, raskmetallide ja muude ainete sisaldus reovees (Karkman et al. 2018). Reoveepuhastitest kanduvad ARG mikroorganismide (sealhugas patogeenide) kaudu loodusesse süvendades nende poolt tekitatud kahju (Wang et al. 2017).

Reovee puhastamine koosneb bioloogilistest ja keemilis-füüsikalistest protsessidest. Antibiootikumijääke eemaldatakse reoveest bioloogilise töötamise ajal biootiliselt (nt mikroorganismide biolagunemise käigus) või abiootiliselt (nt sorptsioon, hüdrolyüs, fotolüüs) (Kumar & Pal, 2018). Üldiselt eemaldavad reoveepuhastusjaamad üsna tõhusalt antibiootikumijääke, kuid ARGde ärastamise efektiivsus on vaieldav (Wang et al. 2017). Alternatiivsete puhastusseadmete kohta ei ole tänapäeval palju andmeid ARBde ja ARGde efektiivsest töötlemisest ja eemaldamisest reoveest (Kumar & Pal, 2018). Ravimijääkide elimineerimiseks kasutatakse erinevaid puhastusmeetodeid (nt aktiivsütt, oksüdatsioon- ja membraanprotsessid, osoonimine). ARGde eemaldamiseks on võimalik kasutada võimsamaid meetodeid nagu fotokatalüütilist osoonimist ning bioelektrokeemilist protsessi, kuigi ka nende protsesside tõhusus on vaieldav (Wang et al. 2017). Reoveepuhastusjaamades on UV/ H_2O_2 protsess kõige tõhusam meetod ARBde kontrollimiseks, kuid on ebaefektiivne ARGde ärastamiseks (Ye et al. 2017). Antibiootikumiresistentsete tüvede levikut aitab vältida reovee efektiivne desinfitseerimine (Kumar & Pal, 2018). Eriti neis reoveepuhastusjaamades, kus bioloogilises puhastusetapis kasutatakse aktiivmuda või bioloogilisi filtreid, leidub hulganisti ARB (Kumar & Pal, 2018). ARGde ja ARBte kontsentratsioon reoveepuhastusjaama sissevoolus on enamasti suurem kui väljavoolus (mitte alati), kus leidub alati teatud kontsentratsioonis ARGsid (Gao et al. 2018). Üldiselt on antibiootikumijääkide kontsentratsioon kõrgeim meditsiini- ja farmatseutika reovees ja madalaim kohalikus reovees ning pinna-, põhja- ja merevees on kontsentratsioon varieeruv (Kümmerer 2009).

Selleks, et antibiootikumijäägid ning antibiootikumiresistentsed tüved ei leviks looduslikku keskkonda, tuleb projekteerida reoveepuhastusjaamu eemaldama efektiivselt ravimijääke ning resistentseid geene ja –baktereid. Kahjuks on tõhusa ärastamise kohta veel suhteliselt vähe informatsiooni (Kumar & Pal, 2018).

1.2.4 Vankomütsiin

Vankomütsiin kuulub antibiootikumide glükopeptiidi klassi, mis on bakteritsiidse toimega Gram-positiivsetele mikroorganismidele (Kang et al. 2015). Esmakordselt isoleeriti vankomütsiin aktinomütsetidest (*Amycolatopsis orientalis*) 1953. aastal Edmund Kornfeldi

poolt (Kang et al. 2015). Vankomütsiini bakteritsiidne toime avaldub selles, et vankomütsiin seostub peptiidsideme tekke kohas peptidoglükaani D-alaniin-D-alaniin otsaga ning pärsib kihtidevaheliste sildade moodustamist, mille tulemusena katkeb rakuseina biosüntees (Ranotkar et al. 2014; van Harten et al. 2017). Glükopeptiidide vastupidavus on tingitud: (1) geeniklastri olemasolust, mis kodeerib ensüüme madala afiinsusega peptidoglükaani prekursorite sünteesiks, milles C-terminaalne A-alaniin (A-Ala) on asendatud D-laktaadiga (D-Lac) (nt *vanA*, *vanB* ja *vanD* geeni tüübi puhul) või on asendunud D-seriiniga (D-Ser) (nt *vanC*, *vanE*, *vanG* geeni tüübi puhul) või (2) tugeva afiinsusega prekursorite elimineerimise tõttu (Courvalin 2005).

Algselt oli vankomütsiin näidustatud penitsilliiniresistentsete (*Staphylococcus aureus*) tüvede raviks (Ranotkar et al. 2014; Kang et al. 2015), kuid nüüd kasutatakse seda enamasti enterokokkide poolt põhjustatud infektsioonide raviks (van Harten et al. 2017). Samuti on soovitatav kasutada vankomütsiini kirurgilise profülaktika eesmärkidel proteesimisel ja muudel protseduuridel, kus on kõrge metitsilliiniresistentsete stafülokokkide oht (Kang et al. 2015). Vankomütsiin on antibiootikum, mida Euroopas kasutatakse viimase võimaluse ravimina multiresistentsete Gram-positiivsete kokkide poolt põhjustatud haiguste ravimiseks (Gudeta et al. 2014; Oravcova et al. 2017).

1.2.5 Vankomütsiini resistentsus

Mõned mikroobid on looduslikult resistentsed vankomütsiini suhtes (nt *Lactobacillus*, *Pedococcus*, *Leuconostoc*), sest nende peptiidid lõppevad D-alaniin-D-laktaadiga (Mikelsaar et al. 2006). Suureks probleemiks on kujunenud mõnede enterokokkide (nt *Enterococcus faecium*) muutumine vankomütsiiniresistentseks (van Harten et al. 2017). Esmakordselt isoleeriti vankomütsiini resistentsed enterokoki tüve (VRE) 1986. aastal. Alatest sellest on vankomütsiiniresistentsus (nt *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*) levinud enterokokkide seas ning samuti on vankomütsiini resistentsusgeenid kandunud edasi ka teistele bakteritele, sealhulgas *Staphylococcus aureusele* (VRSA) (Ranotkar et al. 2014; Kaur et al. 2017). Resistentsust määravad geenid võivad paikneda plasmiidides (nt *vanA*, *vanB*), kus kodeerivad muutusi pentapeptiidi-otstes (Mikelsaar et al. 2006) või kromosoomides (nt *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanO*) (Gudeta et al. 2014; Ranotkar et al. 2014).

Kõige levinum vankomütsiiniresistentsust kodeeriv geen on *vanA*, mis viib aminohappe lipiidi D-alaniini asemel D-laktaadi, vähendades sellega oluliselt vankomütsiini siduvat afiinsust (van Harten et al. 2017; Oravcova et al. 2017). Kliiniliselt olulised enterokokid

kannavad peamiselt *vanA* geeni ning neid on sageli leitud reoveepuhastusjaamade heitveest, mis näitab, et ebapiisav VREde eemaldamine reoveest põhjustab *vanA* geeni kandumist looduskeskkonda (Oravcova et al. 2017).

Samuti on levinud *vanB* geen, mis on üsna sarnane *vanA* geeniga, mille geeniklaster kandub iseseisvalt edasi ühest kromosoomist teise konjugatsiooni teel (Courvalin 2005; van Harten et al. 2017). *VanA* ja *vanB* geenitüübid on tavaliselt seotud *E. faecalis* ja *E. faecium*'iga, mida peetakse kõige rohkem kliiniliselt oluliseks, sest neil on välja arenenud väga tugev vastupanu vankomütsiinile (Koganemaru & Hitomi, 2008). Seevastu *vanC* geen on iseloomulik *E. gallinarum*, *E. flavescens*'ile ja *E. casseliflavus*'ile, mis omab suhteliselt madalat vastupanu vankomütsiinile (Courvalin 2005; Koganemaru & Hitomi, 2008). Lisaks sellele ei ole *vanC* geen ülekantav teistele bakteritele, sel on sisemine vastupanu kodeerides D-Ala ja D-Ser ligaase (Courvalin 2005). *VanC* geen on võrreldes *vanA* ja *vanB* geenidega kliiniliselt vähem olulisem (Koganemaru & Hitomi, 2008).

VanO operon on hiljuti avastatud mullabakterist *Rhodococcus equi*, mis on madala homoloogiaga enterokokkide *van* operonide suhtes. Tõenäoliselt on *vanO* operon enterokokkide omadest eraldi arenenud (60-63% nukleotiidne sarnasus). Kromosoomides paiknev vankomütsiiniresistentsust kodeeriv *vanO* geen on huvipakkuv ka kliiniliselt kuna glükopeptiidantibiootikume kasutatakse *R. equi* infektsioonide raviks ning selle kliinilistes isolaatides on vankomütsiiniresistentsust täheldatud (Gudeta et al. 2014).

1.3 Tehismärgalapuhastid

Aktiivmudaprotsessil põhinevate reoveepuhastite kõrval kasutatakse ka alternatiivseid puhasteid, (nt tehismärgalad, pinnasfiltrid, membraanfiltrid). Tehismärgalad on looduslike märgalade tingimusi jäljendavad inimese poolt konstrueeritud kontrollitavad süsteemid, mis kasutavad erinevaid füüsikalisi, keemilisi ja bioloogilisi mehhanisme ning taimede, pinnase ja mikroorganismide koostoimet reovee puhastamiseks aeroobses, anaeroobses või anoksilises keskkonnas (Wu et al. 2015 (1); Maucieri et al. 2017; Wang et al. 2017). Süsteemi puhastusefektiivsus sõltub oluliselt reovee kogusest ja viibeajast süsteemis, puhasti hüdroloogilisest režiimist, taimestiku olemasolust ja liigist ning orgaanilise aine koormusest (Wang et al. 2017). Tehismärgalapuhastid eemaldavad veest nii tavapärasest reostusest (nt orgaaniline aine, toitained ja mikroorganismid) kui ka spetsiifilisi reoaineid (nt raskmetallid, süsivesinikud, biotsiidid, ravimijäägid ja hormoonid) (Wu et al. 2015 (2)).

Tehismärgalad on kasutuses olnud juba aastakümneid (rohkem kui 50 aastat) ning need süsteemid on määratletud kui jätkusuutlik reovee majandamise võimalus kogu maailmas (Vymazal 2014; Wang et al. 2017). Tehismärgalapuhastid kasutavad keskkonnasõbralikku töötlemistehnoloogiat ning võimaldavad erinevatest allikatest pärit reovee puhastust (nt olmereovesi, põllumajanduslik reovesi, tööstuslik heitvesi, kaevanduse drenaaž, prügila nõrgvesi) (Wu et al. 2015 (1)). Tänu madalatele rajamis- ja hoolduskuludele, minimaalsele energiakasutusele, suurele puhastusefektiivsusele ning võimalusele kasutada vett ja toitaineid korduvalt rajatakse tehismärgalasid üha rohkem (Wu et al. 2015 (1); Wang et al. 2017). Samuti on tehismärgalapuhastid sobilikud vähese asustusega piirkondades ning kaugemates asulates, kus väikese reostuskoormuse tõttu ei ole muud puhastussüsteemid majanduslikult mõistlikud (Wu et al. 2015 (1)).

1.3.1 Tehismärgalapuhastite tüübid

Tehismärgalapuhasteid võib liigitada vastavalt erinevatele parameetritele, kuid kolm kõige olulisemat kriteeriumit puhastite eristamiseks on märgala hüdroloogia (vabaveeline, läbivooluline/ maa-aluse vooluga), veevoolu suund (horisontaalvooluline, vertikaalvooluline) ja makrofüütide olemasolu (taimkate pole kohustuslik) ja kasv (arenev, vabalt ujuv, sukeldunud, ujulehtedega) (Vymazal 2014; Cheng et al. 2018).

Vastavalt vee voolurežiimile saab tehismärgalapuhasteid jagada kolme rühma: ava- ehk vabaveeliseks (FWS– *free water surface*), maa-aluse vooluga horisontaal- või vertikaalvooluliseks (SSF– *subsurface flow*) ja kombineeritud tehismärgalapuhastiteks (hübriidsüsteemid) (Wang et al. 2017).

Vabaveelised tehismärgalad (lisa 2 a) koosnevad madalatest kanalitest või basseinidest, kuhu on istutatud taimestik (nt hõljuv kandiline vesiroos (*Nymphaea tetragona*), vabalt ujuv väike lemmel (*Lemna minor*), veealune hüdrilill (*Hydrilla verticillata*)) (Li et al. 2014; Wu et al. 2015 (1)). Puhastis on madal veetase (40-50 cm) ning aeglane veevoolu kiirus (Vymazal 2014; Maucieri et al. 2017). Selline tehismärgala sarnaneb kõige enam looduslikule, tänu püsivale substraadist üleulatuvale veepinnale ning märgaladele iseloomulikule taimestikule (Wu et al. 2015 (1)). Vabaveelistes tehismärgalades eemaldatakse efektiivselt orgaanilisi ühendeid, lämmastikku (mikroobse lagunemise ja suspenseerunud tahkise kaudu) ning mineraalset heljumit (settimise, dekanteerimise ja filtreerimise kaudu) (Maucieri et al. 2017; Wang et al. 2017). Samuti on võimalik ka fosfori ärastus, kuid see on aeganõudev protsess. Toitainete eemaldamise tõhusus on muutuv ning sõltuv tehismärgala suuruselt ning

hüdraulikast (Wang et al. 2017). Tehismärgala ülemistes veekihtides toimuvad aeroobsed protsessid ja nitrifikatsioon ning põhjakihtides anaeroobsed protsessid ja denitrifikatsioon (Maucieri et al. 2017). Vabaveelisi tehismärgalasid kasutatakse näiteks järelpuhastitena olme-, tööstusliku ja põllumajanduse reovee puhastamisel, lisaks prügila- ja kaevandusvee puhastamiseks (Fonder & Headley, 2013).

Horisontaalvoolulised tehismärgalad (lisa 2 b) on 0,6-0,8 meetrit sügavad, võivad koosneda kergkruusa, kruusa, liiva, tuha või kivi filtrimaterjalist, kuhu võib olla istutatud märgalale iseloomulik taimestik (Maucieri et al. 2017). Reovesi juhitakse filtrisse sissevooluavast, kust edasi vesi liigub mööda horisontaalpinda ning läbib poorset keskkonda ja taimede risosfääri ning väljub väljavooluavast filtri teises otsas (Vymazal 2014; Maucieri et al. 2017). Mineraalset heljunit eemaldatakse filtreerimise, flokulatsiooni või settimise käigus, lämmastik ärastatakse peamiselt denitrifikatsiooni, kuid ka nitrifikatsiooni käigus ning orgaanilisi ühendeid elimineeritakse mikroobsel lagunemisel anoksilises või anaeroobses keskkonnas (Vymazal 2014; Maucieri et al. 2017). Kuna filtrid on enamasti veega küllastunud ja nitrifikatsiooniprotsess on hapniku puudumise tõttu pärsitud, ei ole võimalik horisontaalvoolulisel tehismärgalal efektiivselt eemaldada ammoniaaki (Vymazal 2014). Horisontaalvoolulisi tehismärgalasid kasutatakse väiksemate vooluhulkade juures, näiteks üksikute majade või väiksemate asulate olmereovee puhastamiseks (Fonder & Headley, 2013).

Vertikaalvoolulised tehismärgalapuhastid (lisa 2 c) koosnevad sorteeritud kruusa ja liiva filtermaterjalist, kuhu võivad olla istutatud makrofüüdid (Maucieri et al. 2017). Reovesi juhitakse märgala pinnale, seejärel imendub vesi vertikaalselt alla läbi poorse substraadi kuni jõuab väljavooluavani (Li et al. 2014). Protsessi käigus jõuab hapnik difundeeruda filtrimaterjali pooridesse, mistõttu on seal tagatud hea hapnikuülekanne. Tulemuseks on aeroobne keskkond, mis soodustab nitrifikatsiooni ning takistab denitrifikatsiooni (Maucieri et al. 2017). Vertikaalvoolulised tehismärgalapuhastid eemaldavad reoveest tõhusalt orgaanilist ainet ning mineraalset heljunit (Maucieri et al. 2017). Samuti on neis kõrgem puhastusefektiivsus ammooniumi ärastamisel kui horisontaalvoolulistes tehismärgalapuhastites (Wang et al. 2017). Aeroobsed tingimused on tõhusad nii antibiootikumide lagundamiseks kui ka hormoonide ärastamiseks. Kui arvestada kolme tehismärgala tüüpi siis vertikaalvooluga tehismärgalapuhasti on kõige efektiivsem antibiootikumide ja hormoonide eemaldaja (Cheng et al. 2018). Lisaks olmereovee puhastamisele kasutatakse vertikaalvoolulisi tehismärgalasid näiteks prügila nõrgvee ja põllumajandusliku reovee puhastamiseks (Fonder & Headley, 2013).

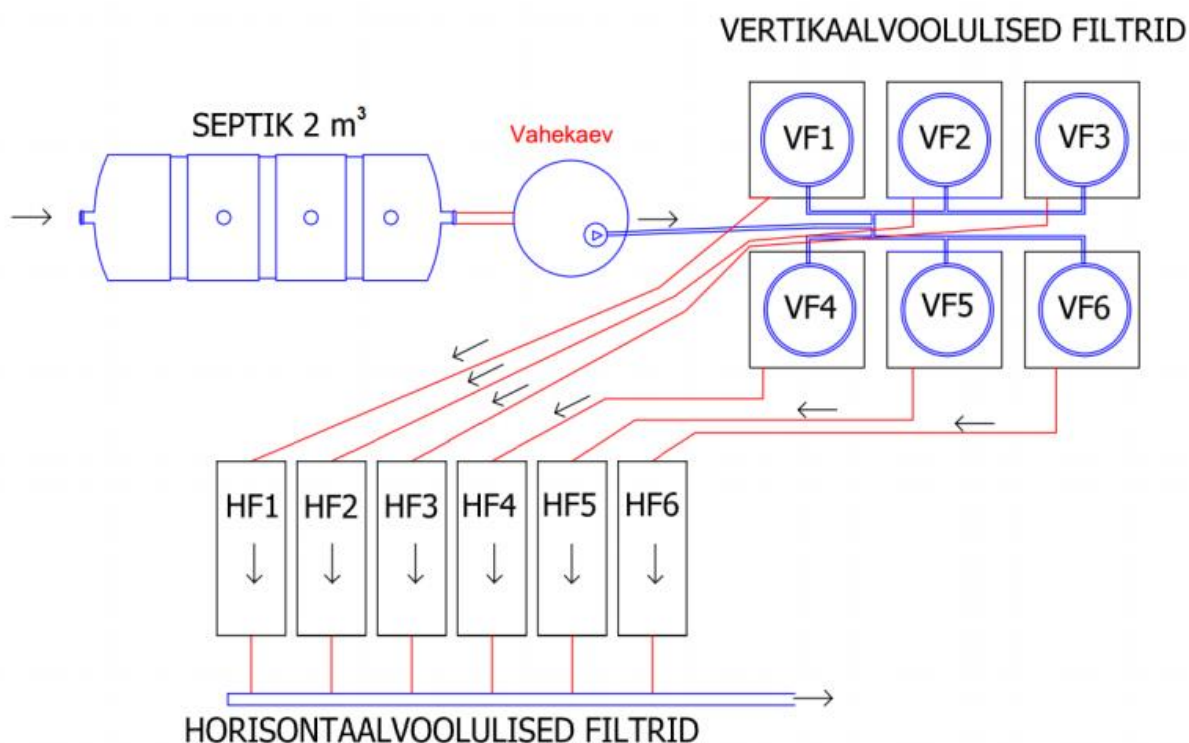
Kombineeritud tehismärgalapuhastid ehk hübriidsüsteemid koosnevad järjestikustest omavahel seotud tehismärgaladest, mis kasutavad ära süsteemide kasulikumaid omadusi, et saavutada kõrgemat puhastusefektiivsust (Maucieri et al. 2017). Näiteks vertikaal- ja horisontaalvoolulisi süsteeme kombineerides saab suurendada lämmastikuärastust. Vertikaalvoolulised tehismärgalad on aeroobsemad, seega on seal paremad tingimused nitrifikatsiooniks. Seevastu horisontaalvoolulistes tehismärgalades domineerib denitrifikatsiooni protsess ning nitrifitseerimisvõime on seal piiratud (Vymazal 2014; Wang et al. 2017). Kombineeritud süsteeme kasutataksegi peamiselt kogu lämmastiku ärastamiseks, sest erinevate tehismärgalade keskkonnad pakuvad erinevaid mikroobikooslusi, mis on vajalikud nitrifikatsiooni või denitrifikatsiooni läbiviimiseks (Wang et al. 2017).

2. Materjal ja metoodika

2.1 Katsesüsteemi kirjeldus

Uuringuobjektiks on valitud Nõo kombineeritud tehismärgalapuhasti katsesüsteem, mis asub Lõuna-Eestis, Tartu maakonnas, Nõo vallas, Nõo aleviku aktiivmudapuhasti territooriumil, mis kuulub ASle Emajõe Veevõrk. Tehismärgala puhastab nii Nõo aleviku olmereovett kui ka lähedal asuva piima- ja lihatööstuse reovett. Reovesi pumbatakse katsesüsteemi (joonis 1), kust see peale pinnasfiltrite läbimist väljub Nõo oja.

Katsesüsteem koosneb septikust (2 m^3), milles reovesi viibib umbes 2 ööpäeva, vahekaevust, mille kogupind on 3 m^2 , kuuest paralleelsest vertikaalse veevooluga pinnasfiltrist (VF) (pikkus, laius, sügavus 1 m; ruumala 1 m^3), kuuest paralleelsest horisontaalse veevooluga pinnasfiltrist (HF) (pikkus 1,5 m, laius 0,6 m, sügavus 0,6 m; ruumala $0,54\text{ m}^3$) ning väljavoolukanalist (joonis 1).



Joonis 1. Nõo kombineeritud tehismärgalapuhasti katsesüsteemi skeem (VF – vertikaalvoolulised pinnasfiltrid, HF – horisontaalvoolulised pinnasfiltrid). Numbrid tähistavad omavahel ühenduses olevaid alamüksuseid.

VFd koosnevad erinevatest kergkruusa kihtidest (ülevaalt-alla): 20 cm paksune kiht, ϕ 10–20 mm fraktsioon; 60 cm paksune aktiivse filtri kiht, ϕ 2–4 mm fraktsioon; ning 20 cm paksune

drenaaži kiht, \varnothing 10–20 mm fraktsioon. Reovee jaotustoru asetseb VF aktiivse kihi pinnal kattekihi sees. Iga VF pinnale jaotati võimalikult ühtlaselt iga 2 tunni järel 5 liitrit reovett (ööpäevas puhastati 60 liitrit reovett). Igast VFst liikus reovesi gravitatsiooniliselt edasi horisontaalfiltrisse, kus viibis 2 ööpäeva ning väljus seejärel Nõo ojja.

Nanoosakeste mõju uurimiseks tehismärgala mikroorganismide kooslustele lisati katse käigus esimesele ja neljandale VFle sünteetilisi hõbeda nanoosakesi (kollargool) ning teisele ja viiendale VFle lisati hõbenitraati ($AgNO_3$) kontsentratsioonidega 0,1 mg Ag/l. Ioonsel kujul hõbeda lisamisega uuriti, kas $AgNO_3$ mõju mikroorganismidele on erinev võrreldes sünteetiliste hõbeda nanoosakestega. Katse kontrollina kasutati kolmandat ja kuuendat VFt, kuhu hõbedat ei lisatud.

2.2 Proovide kogumine

Antud töös kasutatud Vfte sisse- ja väljavoolude vee ning filtermaterjali proovid koguti Nõo kombineeritud pinnasfiltersüsteemist enne nanoosakeste ja hõbenitraadi lisamist 1.09.2014 ja katse lõpus 6.10.2014 Tartu Ülikooli Ökoloogia ja maateaduste instituudi geograafia osakonna keskkonnamikrobioloogia töögrupi töötajate poolt.

Iga VF-i filtermaterjalist võeti kolm osaproovi (umbes 200 g) kolmes eri punktis 20–30 cm sügavuselt jaotustoru alt. Kogutud filtermaterjali proove säilitati DNA eraldamiseni $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures. Veeproove (kokku 14, iga proov umbes 1 liiter) koguti Vfte sissevoolust pärast sepikut asuvast vahekaevust ning iga VF-i väljavoolust. Kogutud veeproove säilitati jahedastis kuni laborisse jõudmiseni ning laboris $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures kuni edasiste analüüsideni (≤ 24 h).

2.3 DNA eraldamine

Nõo tehismärgalapuhasti vertikaalvooluliste pinnasfiltrite filtermaterjali proovidest eraldati DNA 10 g purustatud filtermaterjalist kasutades *PowerMax® Soil DNA Isolation Kit-i* (MoBio, USA) järgides tootja juhendit. Filtermaterjali proovidest eraldas DNA Kadri Saare.

Kogutud veeproove (50 ml) tsentrifuugiti 15 minutit 4000 rpm, kus tekkinud sademest eraldati DNA, kasutades *Power® Soil DNA Isolation Kit-i* (MoBio) vastavalt tootja juhendile. Erandiks oli proovide homogeniseerimiseks mõeldud 10 minutilise vorteksi tsükli

asendus töötlemisega homogenisaatoril *Precellys*® 24 (Bertin Technologies, Prantsusmaa) 20 sekundit 5000 rpm. Veeproovidest eraldas DNA Kertu Tiirik.

Kõiki eraldatud DNAsid säilitati järgnevate analüüsideni -20 °C juures.

Proovivõtul ja DNA eraldamises antud töö autor ei osalenud.

2.4 Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon

Nii vertikaalfiltrite filtermaterjalide kui nende sisse- ja väljavooluvee proovidest määrati bakterite 16S rRNA geeni ja vankomütsiini resistentsust kodeeriva *vanO* geeni arvukused ning *vanA* ja *vanC* geeni esinemine kasutades kvantitatiivset polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR, *quantitative Polymerase Chain Reaction*). Bakterite 16S rRNA geeni amplifikatsioonid teostas Kadri Saare.

2.4.1 QPCR üldtingimused

Kõik qPCR reaktsioonid viidi läbi *RotorGene*® Q (QIAGEN, Foster City, CA, USA) masinas, tarkvaraga *RotorGene Series Software version 2.0.2* (Qiagen). QPCR segu lõppmahus 10 µl sisaldas: 5 µl *Maxima SYBR Green Master Mix* (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, Waltham, USA) reagenti, 0,2 µl optimeeritud kontsentratsioonis (tabel 1) mõlemad märklaudgeenispetsiifilisi praimereid, 1 µl eraldatud DNAd ja 3,6 µl steriilset destilleeritud vett.

Pärast amplifikatsioonireaktsiooni määrati produkti sulamiskõver pideva fluorestsentssignaali mõõtmisega vahemikus 70 °C kuni 90 °C (0,35 °C/3 s). Kõiki proove amplifitseeriti kolmes korduses ning igale mõõtmisele lisati negatiivne kontroll, mis sisaldas kõiki reaktsioonisegu komponente peale märklaud DNA.

2.4.2 *VanA*, *vanC* ja *vanO* geenispetsiifiliste praimerite reaktsioonitingimuste optimeerimine ja määramispiiri leidmine

VanA ja *vanC* geenidele spetsiifilised praimerid valiti kirjanduse põhjal (tabel 1). *VanO* märklaudgeenile spetsiifilisi praimereid kirjandusallikatest ei leitud. Antud töös kasutatav praimeripaari järjestus (tabel 1) on disainitud tarkvaraga Primer 3 Plus (Untergasser et al. 2007) Hiie Nõlvaku poolt.

VanA ja *vanC* praimerite reaktsioonitingimuste optimeerimisel kasutati mõlemat märklaudgeeni sisaldava *Enterococcus casseliflavus* tüve DSM25781 DNAd. *VanO* spetsiifiliste praimerite reaktsioonitingimuste optimeerimisel kasutati 1.09.2014 VF2.2 proovi. Praimerite reaktsioonitingimuste optimeerimisprotsess sisaldas mitut etappi:

- Sobivaima praimerite kontsentratsiooni leidmine qPCR-l gradiendist 0,4 µM, 0,6 µM, 0,8 µM. Muud reaktsiooniparameetrid vastavad peatükis 2.4.1 ja tabelis 1 esitatutele.
- Sobivaima praimerite seondumistemperatuuri leidmine qPCR-l *vanA* puhul gradiendist 62 °C, 61 °C, 60 °C, 59 °C, 58 °C, 57 °C; *vanC* puhul gradiendist 56 °C, 55 °C, 54 °C, 53 °C, 52 °C; ning *vanO* puhul gradiendist 61 °C, 60 °C, 59 °C, 58 °C, 57 °C. Muud reaktsiooniparameetrid vastavad peatükis 2.4.1 ja tabelis 1 esitatutele.
- Praimeripaaride amplifikatsioonispetsiifilisuse kontroll märklaudjärjestuste paljundamisel kasutades polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR – *polymerase chain reaction*) ja geelivaba elektroforeesi (D1000 ScreenTape määramiskomplekt ja 2200 TapeStation süsteem (Agilent Technologies, USA)). Iga märklaudgeeni PCR reaktsioonisegu sisaldas 10 µl 2x *Phusion Master Mix* reagenti (Thermo Fisher Scientific Inc.), 0,5 µl kumbagi praimerit (tabel 1), 7 µl steriliseeritud destilleeritud vett ja 2 µl kontrollproovi. PCR programmi parameetrid olid 98 °C 30 s, 35 tsüklit: 98 °C 10 s, praimeripaarile optimeeritud t° (tabel 1) 30 s, 72 °C 30 s, ja lõppekstensioon 72 °C 8 min. *VanO* geeni puhul teostati märklaudjärjestuse PCR amplifikatsioon mitmes korduses kasutades erinevaid praimerite seondumistemperatuure gradiendi 56 °C – 60 °C ulatuses. TapeStationi analüüsisegu koosnes 3 µl puhvrast (D1000) ja 1 µl PCR produktist.
- Üksikute praimerite amplifikatsioonivõime kontroll qPCR-l *vanA*, *vanC* ja *vanO* geenide puhul vastavalt temperatuuridel 58 °C, 53 °C ja 59 °C. QPCR segu lõppmahus 10 µl sisaldas 5 µl *Maxima SYBR Green Master Mix* (Thermo Fisher Scientific Inc.) reagenti, 0,2 1 uuritavat praimerit (tabel 1), 3,8 µl steriliseeritud destilleeritud vett ning 1 µl kontrollproovi.
- Optimeeritud reaktsioonitingimustel (tabel 1) qPCR-l märklaudgeenide kvantifitseerimisläve (LOQ – *limit of quantification*) määramine reaktsioonitsüklites. *VanO* spetsiifilise praimeripaari määramispiiri (LOQ) leidmisel kasutati lahjendatud 1.09.2014 VF 2.2 proove (lahjendused 10xL, 20xL, 50xL, 100xL). Reaktsioonitingimused vastavad peatükis 2.4.1 ja tabelis 1 esitatuile. LOQ väärtuseks loeti kõige lahjema proovi tsükliläve (C_T) väärtus, millel amplifikatsioon esines kõigis kolmes paralleelis, paralleelide erinevus üksteisest oli <0,5 tsükli ning sulamiskõverate asukoht vastas korrektselt märklaudgeeni lahjendamata kontrollproovi sulamiskõvera asukohale.

2.4.3 *VanO* standard

Vankomütsiini resistentsust kodeeriva *vanO* geeni kvantifitseerimise standardina kasutati vektorisse pEX-A128 kloneeritud märklaujärjestust (*Rhodococcus equi vanO* geeni fragment)- kontsentratsiooniga 10^9 geenikoopiat/ μ l (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Saksamaa), millest valmistati standardlahjenduste rida vahemikus 10^8 - 10^2 , 50, 25, 12 ja 6 geenikoopiat 10 μ l reaktsioonisegu kohta. Seejärel viidi eeltoodud optimeeritud reaktsioonitingimustel (tabel 1, peatükk 2.4.1) läbi standardlahjenduste qPCR. *VanO* standard osutus kasutatavaks vahemikus 10^8 - 10^2 geenikoopiat 10 μ l reaktsioonisegu kohta.

2.4.4 Proovide amplifikatsioon ja andmeanalüüs

Nõo katsesüsteemi vertikaalfiltrite sisse- ja väljavooluvee ning filtermaterjali proovidest amplifitseeriti *vanA*, *vanC* ja *vanO* geenid optimeeritud reaktsioonitingimustel (tabel 1, peatükk 2.4.1) ning saadud tulemuste kvaliteeti analüüsiti *RotorGene Series Software version 2.0.2* tarkvaraga, arvestades sulamiskõverate paiknemist ja kuju ning amplifikatsioonikõverate ühtsust. Hälbivate amplifikatsiooni- ja sulamiskõveratega proovid elimineeriti edasisest analüüsist. Iga proovi individuaalset amplifikatsiooni efektiivsust hinnati programmi *LinRegPCR version 2017.4* abil (Ruijter et al. 2009). Süsteemi vertikaalfiltrite sisse- ja väljavooluvee ning filtermaterjali proove analüüsiti eraldi rühmadena.

Vankomütsiini resistentsusgeenide *vanA* ja *vanC* tuvastamiseks kasutati +/- süsteemi, kus + tähendas vastava geeni eksisteerimist VF filtermaterjali või väljavoolu proovis ning – tähendas vastava geeni puudumist VF filtermaterjali või väljavoolu proovis. Geen loeti tuvastatuks, kui vähemalt kaks kolmest tehnilisest kordusest näitasid positiivset tulemust.

Uuritud proovides *vanO* geenikoopiate arvukuse leidmiseks kasutati kvantifitseerimisstandardit, leides *vanO* resistentsusgeeni kontsentratsiooni proovis (A) ja kvantifitseerimisstandardi erinevate punktide kontsentratsiooni (B) vahelise kordusastme vastavalt valemile (1) (Ruijter et al. 2009)

$$\text{Kordusaste} = N_{0,A}/N_{0,B} = (N_{t,A}/E_{Act,A}) / (N_{t,B}/E_{Bct,B}), \text{ kus :} \quad (1)$$

N_0, A – *vanO* geeni kontsentratsioon proovis fluorestsentsühikutes

N_0, B – *vanO* geeni järjestuse kontsentratsioon standardlahjenduses

E – amplifikatsiooni efektiivsus

N_t – fluorestsentsi läviväärtus

C_t – läviväärtuse saavutamiseks kulunud amplifikatsioonitsükli arv

VanO geeni arvukuse leidmiseks korrutati saadud kordsusaste vastava standardlahjenduse kontsentratsiooniga. Uuritava geeni lõplik arvukus proovis leiti kvantifitseerimisstandardi erinevate punktide (10^8 - 10^2) alusel saadud koopiaarvude ja proovi tehniliste paralleelide aritmeetilisel keskmistamisel. Filtermaterjali proovide puhul taandati koopiaarvud analüüsitud proovi kuivainesisaldusega (KA). Iga VFi filtermaterjali geenide arvukus saadi kolme proovi arvukuste keskmistamisel ning väljendati koopiat/ g * KA kohta. Geenide arvukused veeproovides väljendati koopiat/ ml kohta.

VanO geeni osakaalu leidmiseks VFs jagati *vanO* geeni arvukus proovis bakteriaalse 16S rRNA geeni arvukusega (määratud Kadri Saare poolt). *VanO* geeni arvukuse muutuste määramiseks filtermaterjalis katseperioodi jooksul jagati oktoobrikuu geenide arvukused septembrikuu geenide arvukusega filtermaterjalis.

2.5 Statistiline analüüs

VanO arvukust analüüsitud proovides katse alguses ja lõpus võrreldi kasutades Studenti T-testi. Kasutades ühefaktorilist dispersioonanalüüsi (ANOVA) võrreldi sünteetiliste hõdeda nanoosakestega ja hõbenitraadiga töötluste ning töötlemata kontrollfiltrite *vanO* geeni arvukusi katse lõpus ning määrati kas töötluste vahel esineb või ei esine statistiliselt oluline ($p < 0,05$) erinevus.

Tabel 1. QPCR praimerid ja amplifikatsiooni tingimused

Märklau- deen	Praimer	Praimeri järjestus (5'-3')	Amplikoni suurus (bp)	Praimeri kontsentratsioon (µM)	Praimeri kirjandusviide	qPCR programm
<i>vanO</i>	F	CAGGAGGACTAACCCGAAAC	303	0,6	Disainitud antud töö käigus	50°C 2 min, 95°C 10min, 40 tsüklit: 95°C 15s, 59°C 30s, 72°C 30s
	7R	CTTCTTCCCGTGCATTGTCA		0,6		
<i>vanA</i>	3FP	CTGTGAGGTCGGTTGTGCG	264	0,6	Volkman et al. 2004	50°C 2 min, 95°C 10min, 35 tsüklit: 95°C 15s, 59°C 30s, 72°C 30s
	IR	CGGCCGTTATCTTGTA AAAACAT		0,6	Looft et al. 2012	
<i>vanC</i>	123For	GATGGCWGTATCCAAGGA ¹	644	0,8	Patel et al. 1997	50°C 2 min, 95°C 10min, 35 tsüklit: 95°C 15s, 53°C 30s, 72°C 30s
	(-)	TAGCGGGAGTGMCYMGTA ¹		0,8	Depardieu et al. 2004	
Bakterite 16S rRNA	517F	GCCAGCAGCCGCGGTAA	530	0,6	Liu, et al. 2007	50 °C 2 min, 95 °C 10 min, 35 tsüklit: 95 °C 30 s, 60 °C 45 s, 72°C 45 s
	1028R	CGACARCCATGCASCACCT		0,6	Dethlefsen et al. 2008	

¹ W – A või T; M – A või C; Y – C või T; R – A või G; S – C või G.

3. Tulemused

3.1 *VanA*, *vanC*, *vanO* qPCR programmide optimeerimine

Vankomütsiiniresistentsust kodeerivate *vanA*, *vanC* geenide tuvastamiseks ning *vanO* geeni arvukuse määramiseks optimeeriti qPCR reaktsioonitingimused. Teostati *vanA*, *vanC* ja *vanO* geenidele spetsiifiliste praimerite kontsentratsioonitestid kui ka seondumistemperatuuri testid, mille tulemused on esitatud lisa 3 ja 4. Antud töös tehismärgalapuhasti proovidest vankomütsiiniresistentsust kodeerivate geenide tuvastamiseks kasutati optimaalseid qPCR reaktsioonitingimusi, mis on väljatoodud tabelis 2.

Tabel 2. *VanA*, *vanC*, *vanO* praimerite optimeeritud seondumistemperatuurid ja kontsentratsioonid.

Märklaudgeen	Temperatuur (°C)	Praimeri kontsentratsioon (µM)
<i>vanA</i>	59	0,6
<i>vanC</i>	53	0,8
<i>vanO</i>	59	0,8

Praimeripaaride amplifikatsioonispetsiifilisuse kontroll näitas ebaspetsiifiliste lisaproduktide puudumist *vanC* geeni puhul ning mõningast lisaproduktide esinemist *vanA* ja *vanO* geeni paljundamisel (lisa 7). Ühegi märklaudgeeni puhul üksikute praimerite ebaspetsiifilist amplifikatsiooni ei tuvastatud. *VanO* geeni määramispiir oli $C_T=28,8$.

3.2 Vankomütsiini resistentsusgeenide *vanA*, *vanC* ja *vanO* esinemine Nõo tehismärgalapuhasti vertikaalfiltri sissevoolus, filtermaterjalis ja väljavoolus

Vankomütsiiniresistentsust kodeerivate *vanA* ja *vanC* geenide esinemist ning *vanO* geeni arvukust ja proportsiooni bakterikoosluses (bakteriaalse 16S rRNA geeni suhtes) hinnati nii Nõo tehismärgalapuhasti VFte filtermaterjalist kui ka nende sisse- ja väljavoolu veest.

3.2.1 Vankomütsiini resistentsusgeenide esinemine VFsse sissevoolavas reovees

Katse alguses ei tuvastatud vankomütsiiniresistentsust kodeerivaid *vanA* ja *vanC* geene Nõo tehismärgalapuhasti VFsse sissevoolavast reoveest ning katse lõpus avastati sissevoolavast reoveest vaid *vanC* geen (lisa 6). Kogu katseperioodi jooksul oli sissevoolavas reovees *vanO* geeni arvukus alla määramispiiri ($LOQ=1,6 \times 10^3$ koopiat/ ml) (joonis 3) ning bakterite üldarvukust iseloomustav 16S rRNA geeni arvukus vahemikus $7,65 \times 10^7$ kuni $1,84 \times 10^8$ koopiat/ ml (lisa 6).

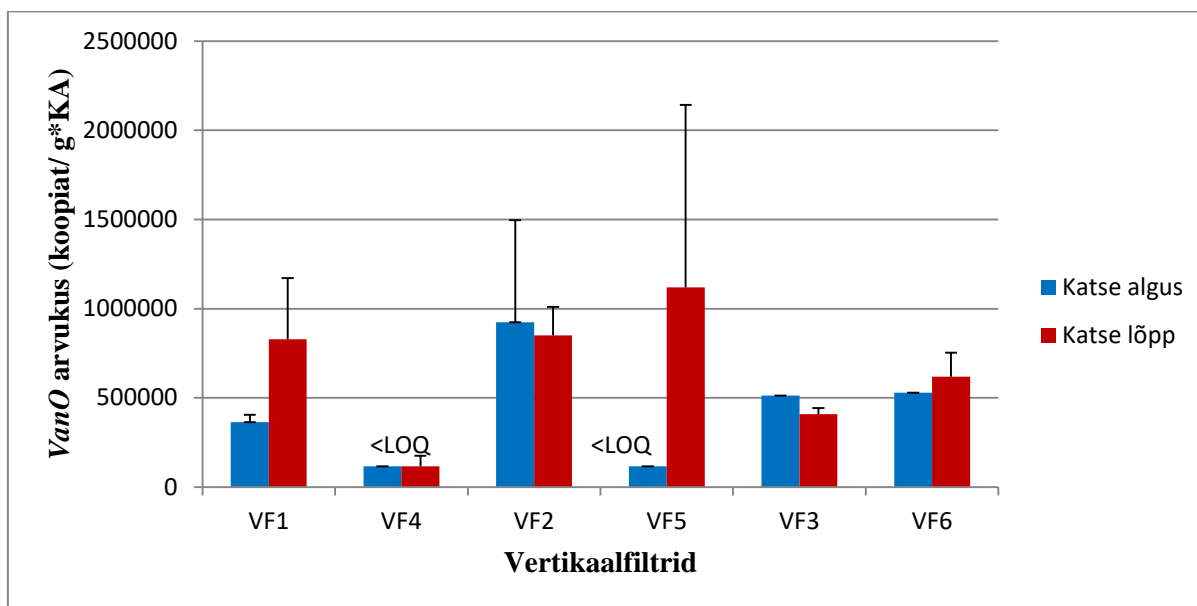
3.2.2 Vankomütsiini resistentsusgeenide esinemine VF filtermaterjalis

Katse alguses ei tuvastatud VF filtermaterjali proovidest vankomütsiini resistentsusgeeni *vanC* ning katse lõpus leiti seda vaid ühest kontrollfiltrist (VF6.1) proovist (lisa 5). *VanA* geeni leiti katse alguses vaid ühest (VF1.3) filtermaterjali proovist. Katse lõpus tuvastati *vanA* geeni kahes (VF1.1; VF2.1) filtermaterjali proovis, mis olid vastavalt töödeldud sünteetiliste hõbeda nanoosakestega ning hõbenitraadiga (lisa 5).

Katse alguses jäi paljudes VFte proovides (VF1.3; VF2.1; VF3.2-3.3; VF4.1-4.3; VF5.1-5.3; VF6.1-6.2) *vanO* geeni arvukus alla määramispiiri ($LOQ < 1,17 \times 10^5$ koopiat/(g * KA)). Katse lõpus jäi *vanO* geeni arvukus $< LOQ$ proovides (VF1.3; VF2.3; VF3.3; VF4.1; VF5.1). *VanO* geeni arvukus VF filtermaterjalis oli katseperioodi vältel vahemikus $3,35 \times 10^5$ kuni $1,84 \times 10^6$ koopiat/(g * KA) ning *vanO* geeni proportsioon koosluses vahemikus 0,0016 % kuni 0,0453 %. Katseperioodi lõpuks oli *vanO* geeni arvukus filtermaterjalis kõikuv, pooltes vertikaalfiltrites (VF1; VF5; VF6) oli *vanO* geeni arvukus kasvanud ning teistes (VF2; VF3; VF4) kahanenud (joonis 2).

Pärast töötluste rakendamist oli *vanO* geeni arvukus tõusnud kuni ühe suurusjärgu võrra ulatudes nanohõbedaga töödeldud vertikaalfiltrites (VF 1 ja VF 4) kuni $1,07 \times 10^6$ koopiat/(g * KA). Hõbenitraadiga töödeldud vertikaalfiltris (VF 2) geeni arvukus vähenes 1,09 korda ning vertikaalfiltris (VF 5) arvukus suurenes 9,56 korda. Töötlemata kontroll vertikaalfiltris VF 3 oli *vanO* geeni arvukus vähenenud 1,25 korda ning kontroll vertikaalfiltris VF 6 suurenenud 1,16 korda (joonis 2). Kogu katseperioodi jooksul oli VF filtermaterjalis bakterite üldarvukust iseloomustav 16S rRNA geeni arvukus vahemikus $1,86 \times 10^9$ kuni $4,91 \times 10^{10}$ koopiat/(g * KA) (lisa 5). T-testi alusel ei ole *vanO* arvukuse muutus töötluste käigus statistiliselt oluline. ANOVA alusel tehtud analüüs näitas, et ka erinevate

töötluste vahel statistiliselt olulisi erinevusi *vanO* geeni arvukuses ei esine ($p>0,05$).
 Detailed qPCR tulemused on esitatud lisa 5.



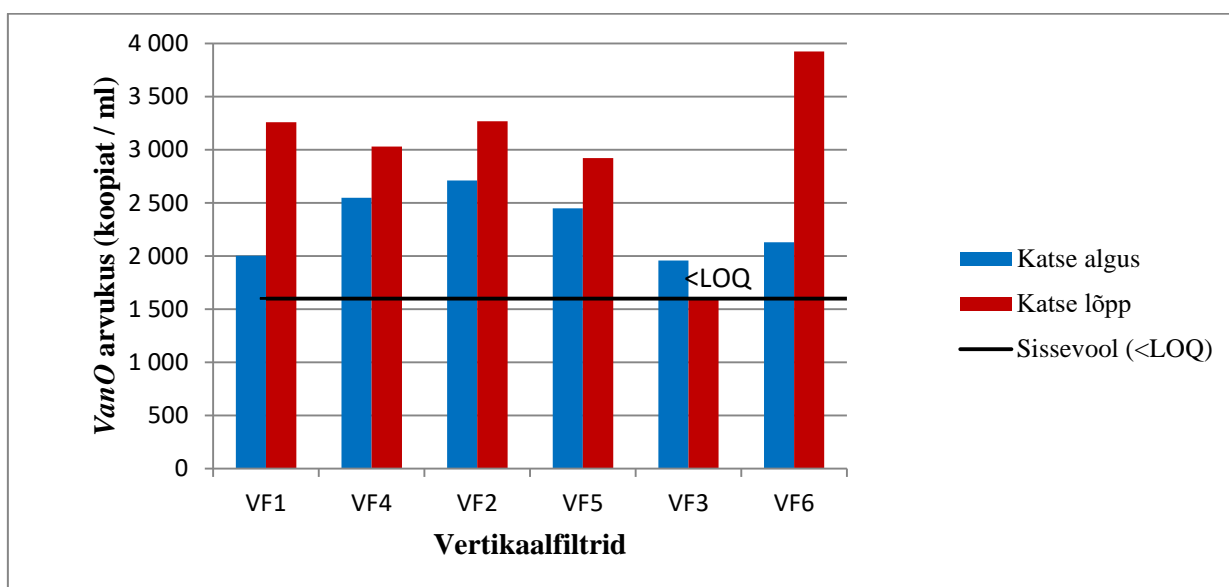
Joonis 2. *VanO* geeni arvukus Nõo katsesüsteemi VFte filtermaterjalis (koopiat/(g * KA)).
 <LOQ – alla määramispiiri ($1,17 \times 10^5$ koopiat/(g * KA)). VF1le ja VF4le oli lisatud sünteetilisi hõbeda nanoosakesi, VF2le ja VF5le oli lisatud hõbenitraat ($AgNO_3$) ning VF3 ja VF6 olid töötlemata kontrollfiltrid. Näidatud on iga vertikaalfiltri kolme proovi keskmised ja standardhälbed ($n=3$).

3.2.3 Vankomütsiini resistentsusgeenide esinemine VFst väljavoolavas vees

Nõo katsesüsteemi VFtest väljavoolavast veest tuvastati vankomütsiini resistentsust kodeerivate *vanA* ja *vanC* geenide olemasolu. *VanC* geen esines nii katse alguses kui ka katse lõpus VFst väljavoolavas heitvees ning *vanA* geeni olemasolu tuvastati vaid katse alguses ühes VF väljavoolu veeproovis (lisa 6).

VanO geeni arvukus VF väljavooludes oli katseperioodi vältel vahemikus $1,62 \times 10^3$ kuni $4,19 \times 10^3$ koopiat/ ml, vaid oktoobri VF3 väljavoolus jäi *vanO* arvukus alla määramispiiri ($LOQ=1,6 \times 10^3$ koopiat/ ml). Katseperioodi vältel oli *vanO* geeni proportsioon bakterikoosluses vahemikus 0,001 % kuni 0,032 %. Katseperioodi lõpuks oli *vanO* geeni arvukus VF väljavoolus enamasti suurenenud (joonis 3). Kogu katseperioodi jooksul oli VFst väljavoolavas vees bakterite üldarvukust iseloomustav 16S rRNA geeni arvukus vahemikus $6,40 \times 10^6$ kuni $3,04 \times 10^8$ koopiat/ ml.

Pärast töötluste rakendamist oli *vanO* geeni arvukus tõusnud, ulatudes nanohõbedaga töödeldud VFte väljavoolus (VF 1 ja VF 4) kuni $3,48 \times 10^3$ koopiat/ ml ning hõbenitraadiga töödeldud VFte väljavoolus (VF 2 ja VF 5) kuni $3,91 \times 10^3$ koopiat/ ml. T-test alusel ei olnud *vanO* arvukuse suurenemine Nõo tehismärgalapuhasti VFde väljavoolus katseperioodil siiski statistiliselt oluline ($p > 0,5$). Kontrollina kasutatud töötlemata VFte tulemused olid lahknevad: VF 3 väljavoolus *vanO* geeni arvukus vähenes 1,22 korda ning VF6 väljavoolus arvukus suurenes 1,84 korda (joonis 3). ANOVA alusel tehtud analüüs näitas, et töötluste vahel statistiliselt olulisi erinevusi ei esinenud. Detailed qPCR tulemused on esitatud lisas 6.



Joonis 3. *VanO* geeni arvukus Nõo katsesüsteemi VFte sisse- ja väljavoolus. <LOQ – alla määramispiiri ($1,6 \times 10^3$ koopiat/ ml). VF1le ja VF4le oli lisatud sünteetilisi hõbedanaanosakesi, VF2le ja VF5le oli lisatud hõbenitraati ($AgNO_3$) ning VF3 ja VF6 olid töötlemata kontrollfiltrid. Nivoojoon märgistab sissevoolu, milles *vanO* väärtused oli alla määramispiiri (LOQ= $1,6 \times 10^3$ koopiat/ ml).

Arutelu ja järeldused

Käesolevas töös uuriti vankomütsiini resistentsusgeenide *vanA*, *vanC* esinemist ja *vanO* arvukust Nõo tehismärgala puhasti VF filtermaterjalis ning väljavoolust enne ja pärast sünteetilise hõbeda nanoosakestega töötlemist. Nanohõbe on kavandatud inhibeerima mikroorganismide aktiivsust ja tavaliselt vähendab reoveepuhastite puhastusefektiivsust (Sun et al. 2013), järeltult võivad nanoosakesed mõjutada ARGde esinemist ja levikut. Võrdlusena kasutati hõbenitraadiga töötlemist ning kontrollrühma, mille puhul töötlust ei teostatud.

Tehismärgalas elavad mikroobikooslused omavad tähtsat funktsiooni toitainete biogeokeemilises puhastusringluses (Ligi et al. 2014). Kõigis uuritud filtermaterjali biokilledes oli bakterite üldarvukust iseloomustav 16S rRNA geeni arvukus (Zhang et al. 2016) vahemikus $1,86 \times 10^9$ kuni $4,91 \times 10^{10}$ koopiat/(g * KA). Samas suurusjärgus 16S rRNA geeni arvukusi täheldati ka teistes tehismärgalade uuringutes (Nõlvak et al. 2013; Ligi et al. 2014). Töö tulemused näitavad, et VF filtermaterjalis katseperioodi jooksul bakterite üldarvukus kasvas ning ületas bakterite arvukuse kasvu VF väljavoolus kuni kolm suurusjärku. Kõik muutused bakterite üldarvukustest olid sarnased, vaatamata erinevatele VFte töötlustele.

Vankomütsiiniresistentsust kodeerivate *vanA* ja *vanC* geenide puhul uuriti nende esinemist sisse- ja väljavoolu vees ning VF filtermaterjalis ja *vanO* geeni puhul määrati ka selle arvukus. Kogu katseperioodi jooksul ei tuvastatud vankomütsiiniresistentsusgene sissevooluveest, välja arvatud *vanC* geen, mis esines vaid katse lõpu sissevoolu proovis.

Kõige levinumat ja kliiniliselt olulisemat vankomütsiiniresistentsuse tüüpgeeni *vanA* (van Harten et al. 2017) tuvastati kogu katseperioodi jooksul vaid vähestest VF filtermaterjali proovidest, mida oli töödeldud sünteetiliste hõbeda nanoosakestega ning hõbenitraadiga. Sellest võib järeldada, et seda kõige tüüpilisemat omandatud resistentsusmekanismiga vankomütsiini resistentsusgeeni (Oravcova et al. 2017) esineb Nõo tehismärgalapuhastis sporaadiliselt, kuid suurema tõenäosusega erinevas vormis hõbeda poolt mõjutatud filtrites. Ka *vanC* geeni esinemine VF filtermaterjalis on juhuslik, kuna *E. gallinarum*'ile, *E. casseliflavus*'ile ja *E. flavescens*'ile iseloomulikku *vanC* geeni (Courvalin 2005) leiti vaid ühest kontroll-filtermaterjali proovist. Järelikult saab oletada, et Nõo tehismärgalapuhasti VF filtermaterjalis on vankomütsiiniresistentsust kodeerivate *vanA* ja *vanC* geenide esinemissagedus üldiselt madal.

Hiljuti avastatud ning *R. equi*'le omase (Gudeta et al. 2014) vankomütsiiniresistentsust kodeeriva *vanO* geeni arvukused VF filtermaterjalis töötluste käigus enamasti kasvasid, olles vahemikus $3,35 \times 10^5$ kuni $1,84 \times 10^6$ koopiat/(g * KA). Sellest saab järeldada, et Nõo tehismärgalapuhasti VFtes elav bakterikooslus omab vankomütsiini resistentsusgeeni *vanO* ning võib soodustada selle levimist. Siiski täheldati erinevate töötluste võrdlemisel kontroll-filtritega, et sünteetiliste hõbeda nanoosakeste ega hõbenitraadi lisamine ei mõjutanud oluliselt vankomütsiiniresistentsust kodeeriva *vanO* geeni arvukust. Ehkki vankomütsiiniresistentse *vanO* geeni proportsioon VF filtermaterjalis vähenes, siis *vanO* geeni arvukus VF filtermaterjalis kasvas, seda võib põhjendada üldise bakterikoosluste arvukuse (16S rRNA arvukuse) kasvuga.

Nõo tehismärgalapuhasti VFte väljavooluveest leiti *vanA* geeni sünteetilise hõbeda nanoosakestega töödeldud VF väljavoolu proovist ning *vanC* geen oli tuvastatud peaaegu kõikides VF väljavoolu proovidest. Samuti tuvastati vankomütsiiniresistentset unikaalse struktuuriga *vanO* geeni (Gudeta et al. 2014) kõikidest VF väljavoolu proovidest (v.a. oktoobrikuu VF3); sealjuures *vanO* arvukus VFte väljavooludes katse jooksul enamasti kasvas. Leiti ka, et hõbeda nanoosakeste lisamine ei mõjutanud *vanO* geeni arvukuse tõusu vertikaalfiltritest väljavoolavas vees teistest töötlusvariantidest erinevalt. Mõned hiljutised uuringud on samuti näidanud, et reoveepuhasti väljavoolus on tihti peale kõrgemad ARG näitajad kui sissevoolus (Kumar & Pal, 2018).

Isegi peale reovee käitlemist võib heitvesi mingil määral sisaldada mikroorganisme ning ARGe (Kumar & Pal, 2018). Seda tõendavad ka antud töö tulemused, mis näitavad, et Nõo tehismärgalapuhasti väljavooluvees esineb vankomütsiiniresistentsusgeene suuremal määral kui sissevoolavas reovees. Varasemates uuringutes on sarnast tendentsi täheldatud vankomütsiiniresistentsete enterokokkide puhul (Taučer-Kapteijn et al. 2016). Selgus, et ehkki hõbeda nanoosakeste esinemine reovees ei mõjuta oluliselt vankomütsiiniresistentsete mikroorganismide arvukust puhastis, on Nõo tehismärgalapuhasti vertikaalfiltrite bakterikooslus vankomütsiini resistentsusgeenide reservuaariks ning *vanA*, *vanC* ja *vanO* geenid levivad vähesel määral tehismärgalapuhastist väljavoolu veega looduskeskkonda.

Kokkuvõte

Antibiootikumide pidev kasutamine inimeste ja loomade ravis toob endaga kaasa tõsiseid keskkonna- ning terviseprobleeme. Sageli on see tingitud antibiootikumijääkide ja antibiootikumiresistentsete organismide kõrge kontsentratsioonist reovees, milles lisaks sellele leidub veel nanoosakesi ning muid aineid, mis võivad soodustada ARBte ja ARGde teket ja paljunemist. Eriti nanohõbeda kasutamine on tõusuteel ning selle kogused olmereovees suurenevad, samas on selle mõju ARBde ja ARGde arvukusele vähe uuritud.

Käesolevas töös hinnati sünteetiliste hõbeda nanoosakeste mõju vankomütsiini resistentsusgeeni *vanO* arvukusele ning määrati vankomütsiiniresistentsust kodeerivate *vanA* ja *vanC* geenide olemasolu Nõo tehismärgalapuhasti VF filtermaterjalist ning väljavoolu vee bakterikoosluses qPCR meetodil.

Töö käigus saadud tulemused näitavad, et sünteetiliste hõbeda nanoosakeste ja hõbenitraadi olemasolu reovees ei oma olulist mõju vankomütsiiniresistentsust kodeerivate *vanA*, *vanC*, *vanO* geenide esinemisele ja arvukusele tehismärgalapuhasti vertikaalfiltrites. Nõo tehismärgalapuhastis esineb nii *vanA* kui ka *vanC* geeni sporaadiliselt. Vankomütsiiniresistentsust kodeeriva *vanO* geeni arvukused olid VF filtermaterjali proovides kõikuvad, kuid enamasti suurenesid VF väljavoolusdes (v.a. VF3).

Tulemuste põhjal saab järeldada, et vankomütsiini resistentsust kodeerivate *vanA*, *vanC* ja *vanO* geenide sisaldus Nõo tehismärgalapuhastis on suhteliselt madal. Siiski satub neid geene puhasti väljavoolust looduskeskkonda. Põhjusena võib tuua asjaolu, et vankomütsiin, viimase võimaluse ravim, ei ole kõige levinum ning tarbitavam antibiootikum Eestis. Samuti ei voola Nõo tehismärgalapuhastisse haigla reovesi, kus kasutatakse vankomütsiini suuremal määral. Antud töös uuriti madala (0,1 mg Ag/l) sünteetiliste hõbeda nanoosakeste kontsentratsioonide mõju tehismärgala mikroobikooslusele. Tulevikus võiks uurida eri tüüpi nanoosakeste mõju tehismärgalas elavate mikroorganismikooslustele ning nende poolt läbiviidavatele protsessidele.

The effect of synthetic silver nanoparticles on presence and abundance of vancomycin resistance genes *vanA*, *vanC*, *vanO* in microbial community of Nõo constructed wetland vertical flow filters and effluent

Edith Simoniš

Summary

The comprehensive use of antibiotics in medical, veterinary and agriculture purposes results in the continuous release of antibiotics into the environment, leading to the increasingly widespread occurrence of antibiotic resistance. Particularly the use of synthetic silver nanoparticles is on the rise and its amounts in urban wastewater are increasing, while its impact on the abundance of ARBs and ARGs has been little studied.

Constructed wetlands have been designed and constructed to treat wastewater by a series of natural processes involving plants, soil/sediment and microorganisms. The removal efficiency of antibiotics in constructed wetlands has been demonstrated to be comparable to or even better than in conventional wastewater treatment processes. However, the fate of antibiotic resistant microbes and antibiotic resistance genes (especially those conferring resistance to more marginal but clinically vital antibiotics such as vancomycin) during wastewater treatment in constructed wetlands is poorly described.

The aim of this study was to explore the impact of synthetic silver nanoparticles to the presence and abundance of vancomycin resistance genes *vanA*, *vanC*, *vanO* in microbial community in the influent, effluent and filter material of the vertical flow filters of Nõo constructed wetland using the qPCR method. Investigated treatment system consisted of six vertical subsurface flow filters, two of which were treated with synthetic silver nanoparticles (0,1 mg/l) (VF1; VF4), two were treated with $AgNO_3$ (0,1 mg/l) (VF2; VF5) and two were control systems (VF3; VF6).

The results showed that the silver nanoparticles and $AgNO_3$ did not have significant impact on the presence of vancomycin resistance genes *vanA* and *vanC* nor on *vanO* gene abundances in vertical subsurface flow filters. The *vanA* and *vanC* genes existence is sporadic in Nõo constructed wetland. Vancomycin resistance gene *vanO* abundances in vertical subsurface flow filters filter material was quite low and unstable but generally increased in the effluent (except for VF3). Consequently, Nõo constructed wetland can be considered as a reservoir and dissemination node of vancomycin resistance genes from where relatively small concentrations of *van* genes are dispersed into the environment.

In this study was researched impact of a low (0,1 mg Ag/l) concentration of syntetic silver nanoparticles and silver nitrate to the microorganisms of the constructed wetland. In the future researches we could explore the effects of different types of nanoparticles to the migroorganism communities existing in the constructed wetland and also to their processes.

Tänuavaldused

Antud bakalaureusetöö autor avaldab suurt tänu juhendajale Hiie Nõlvak suure pühendumise ja igakülgse abistamise eest. Tänud kuuluvad ka Kertu Tiirikule ja Kadri Saarele. Käesoleva bakalaureusetööga seotud kulutused on kaetud projektist „Ravimijäägid ja sünteetilised nanoosakesed reovees: mõju reoveepuhastusprotsessile ja ravimresistentsuse geenide levikule keskkonnas“ (3.2.0801.11-0026).

Kasutatud kirjandus

1. Auguet, O., Pijuan, M., Borrego, C.M., Rodriguez-Mozaz, S., Triado-Margarit, X., Giustina, S.V.D., Gutierrez, O., (2017). Sewers as potential reservoirs of antibiotic resistance. *Science of the Total Environment*, 605–606, 1047–1054.
2. Bcc Research (2017), vaadatud 20.12.2017. <https://www.bccresearch.com/market-research/nanotechnology/nanocomposites-nanoparticles-nanotubes-market-report-nan021g.html>
3. Berendonk, T.U., Manaia, C.M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Bürgmann, H., Sørum, H., Norström, M., Pons, M.-N., Kreuzinger, N., Huovinen, P., Stefani, S., Schwartz, T., Kisand, V., Baquero, F., Martinez, J.L., (2015). Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nature Reviews Microbiology*, 13, 310–317.
4. Bouki, C., Venieri, D., Diamadopoulos, E., (2013). Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 91, 1–9.
5. Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., (2010). Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge – Evidence and impacts. *Waste Management*, 30, 504–520.
6. Carvalho, I.T., Santos, L., (2016). Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. *Environment International*, 94, 736–757.
7. Chaudhary, A.S., (2016). A review of global initiatives to fight antibiotic resistance and recent antibiotics' discovery. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 6(6), 552–556.
8. Cheng, D.L., Ngo, H.H., Guo, W.S., Liu, Y.W., Zhou, J.L., Chang, S.W., Nguyen, D.D., Bui, X.T., Zhang, X.B., (2018). Bioprocessing for elimination antibiotics and hormones from swine wastewater. *Science of the Total Environment*, 621, 1664–1682.
9. Courvalin, P., (2005). Genetics of glycopeptide resistance in Gram-positive pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 294, 479–486.
10. Depardieu, F., Perichon, B., Courvalin, P., (2004). Detection of the *van* alphabet and identification of Enterococci and Staphylococci at the species level by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12), 5857–5860.
11. Ding, C., He, J., (2010). Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. *Applied Microbiology Biotechnology*, 87, 925–941.
12. Fernandes, P., Martens, E., (2017). Antibiotics in late clinical development. *Biochemical Pharmacology*, 133, 152–163.

13. Fijalkowski, K., Rorat, A., Grobelak, A., Kacprzak, M.J., (2017). The presence of contaminations in sewage sludge – The current situation. *Journal of Environmental Management*, 203, 1126–1136.
14. Fonder, N., Headley, T., (2013). The taxonomy of treatment wetlands: A proposed classification and nomenclature system. *Ecological Engineering*, 51, 203–211.
15. Friedman, N.D., Temkin, E., Carmeli, Y., (2016). The negative impact of antibiotic resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 22, 416–422.
16. Gao, H., Zhang, L., Lu, Z., He, C., Li, Q., Na, G., (2018). Complex migration of antibiotic resistance in natural aquatic environments*. *Environmental Pollution*, 232, 1–9.
17. Grenni, P., Ancona, V., Caracciolo, A.B., (2018). Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchemical Journal*, 136, 25–39.
18. Grillo, R., Rosa, A.H, Freccato, L.F., (2015). Engineered nanoparticles and organic matter: A review of the state-of-the-art. *Chemosphere*, 119, 608–619.
19. Gudeta, D.D., Moodley, A., Bortolaia, V., Guardabassi, L., (2014). vanO, a new glycopeptide resistance operon in environmental *Rhodococcus equi* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(3), 1768–1770.
20. Guo, Z., Chen, G., Zeng, G., Yan, M., Huang, Z., Jiang, L., Peng, C., Wang, J., Xiao, Z., (2017). Are silver nanoparticles always toxic in the presence of environmental anions? *Chemosphere*, 171, 318–323.
21. Huang, J., Cao, C., Yan, C., Liu, J., Hu, Q., Guan, W., (2017). Impacts of silver nanoparticles on the nutrient removal and functional bacterial community in vertical subsurface flow constructed wetlands. *Bioresource Technology*, 243, 1216–1226.
22. Inyinbor, A.A., Bello, O.S., Fadiji, A.E., Inyinbor, H.E., (2018). Threats from antibiotics: A serious environmental concern. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6, 784–793.
23. Jiang, H.S., Yin, L., Ren, N.N., Xian, L., Zhao, S., Li, W., Gontero, B., (2017). The effect of chronic silver nanoparticles on aquatic system in microcosms. *Environmental Pollution*, 223, 395–402.
24. Kang, D.G., Holekamp, T.F., Wagner, S.C., Lehman Jr, R.A., (2015). Intrasite vancomycin powder for the prevention of surgical site infection in spine surgery: a systematic literature review. *The Spine Journal*, 15, 762–770.
25. Taučer-Kapteijn, M., Hoogenboezem, W., Heiligers, L. De Bolster, D., Medema, G., (2016). Screening municipal wastewater effluent and surface water used for drinking

- water production for the presence of ampicillin and vancomycin resistant enterococci. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 219, 437–442.
26. Karkman, A., Do, T.T., Walsh, F., Virta, M.P.J., (2018). Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water. *Trends in Microbiology*, 26 (3), 220–228.
 27. Kaur, A., Goyal, D., Kumar, R., (2017). Surfactant mediated interaction of vancomycin with silver nanoparticles. *Applied Surface Science*, available online 8 December 2017.
 28. Klaine, S.J., Alvarez, P.J.J., Batley, G.E., Fernandes, T.F., Handy, R.D., Lyon, D.Y., Mahendra, S., McLaughlin, M.J., Lead, J.R., (2008). Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(9), 1825–1851.
 29. Koganemaru, H., Hitomi, S., (2008). Bacteremia caused by VanC-type enterococci in a university hospital in Japan: a 6-year survey. *Japanese Infect Chemother*, 14, 413–417.
 30. Kumar, A., Pal, D., (2018). Antibiotic resistance and wastewater: Correlation, impact and critical human health challenges. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6, 52–58.
 31. Kümmerer, K., (2009). Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere*, 75, 417–434.
 32. Li, Y., Zhu, G., Ng, W.J., Tan, S.K., (2014). A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: Design, performance and mechanism. *Science of the Total Environment*, 468–469, 908–932.
 33. Ligi, T., Oopkaup, K., Truu, M., Preem, J.K., Nõlvak, H., Mitsch, W.J., Mander, Ü., Truu, J., (2014). Characterization of bacterial communities in soil and sediment of a created riverine wetland complex using high-throughput 16S rRNA amplicon sequencing. *Ecological Engineering*, 72, 56–66.
 34. Lippmaa, E., Kahru, A., (2010). Nanode ilu ja valu. *Horisont* 3, 8–14.
 35. Looft, T., Johnson, T.A., Allen, H.K., Bayles, D.O., Alt, D.P., Stedtfeld, R.D., Sul, W.J., Stedtfeld, T.M., Chai, B., Cole, J.R., Hashsham, S.A., Tiedje, J.M., Stanton, T.B., (2012). In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 109 (5), 1691–1696.
 36. Lüneberg, K., Prado, B., Broszat, M., Dalkmann, P., Díaz, D., Huebner, J., Amelung, W., López-Vidal, Y., Siemens, J., Grohmann, E., Siebe, C., (2018). Water flow paths are hotspots for the dissemination of antibiotic resistance in soil. *Chemosphere*, 193, 1198–1206.

37. MacGowan, A., Macnaughton, E., (2017). Antibiotic resistance. *Medicine*, 45, 622–628.
38. Maucieri, C., Barbera, A.C., Vymazal, J., Borin, M., (2017). A review on the main affecting factors of greenhouse gases emission in constructed wetlands. *Agricultural and Forest Meteorology*, 236, 175–193.
39. McGillicuddy, E., Murray, I., Kavanagh, S., Morrison, L., Fogarty, A., Cormican, M., Dockery, P., Prendergast, M., Rowan, N., Morris, D., (2017). Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology. *Science of the Total Environment*, 575, 231–246.
40. Mikelsaar, M., Karki, T., Lutsar, I., Mändar, R., (2006). Antibakteriaalsed preparaadid, lk 117-123. *Meditiiniline mikrobioloogia I osa*, teine trükk. Tartu: Tartu Ülikooli Kirjastus.
41. Nowack, B., Bucheli, T.D., (2007). Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution*, 150, 5–22.
42. Nõlvak, H., Truu, M., Tiirik, K., Oopkaup, K., Sildvee, T., Kaasik, A., Mander, Ü., Truu, J., (2013). Dynamics of antibiotic resistance genes and their relationships with system treatment efficiency in a horizontal subsurface flow constructed wetland. *Science of the Total Environment*, 461-462, 636-644.
43. Oravcova, V., Mihalcon, M., Zakova, J., Pospisilova, L., Masarikova, M., Literak, I., (2017). Vancomycin-resistant enterococci with vanA gene in treated municipal wastewater and their association with human hospital strains. *Science of the Total Environment*, 609, 633–643.
44. Page, G.L., Gunnarsson, L., Snape, J., Tyler, C.R., (2017). Integrating human and environmental health in antibiotic risk assessment: A critical analysis of protection goals, species sensitivity and antimicrobial resistance. *Environment International*, 109, 155–169.
45. Pandey, R.K., Prajapati, V.K., (2018). Molecular and immunological toxic effects of nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 1278–1293.
46. Patel, R., Uhl, J.R., Kohner, P., Hopkins, M.K., Cockerill, F.R., (1997). Multiplex PCR detection of vanA, vanB, vanC-1, and vanC-2/3 genes in enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(3), 703-707.
47. Ranotkar, S., Kumar, P., Zushi, S., Prashanth, K.S., Bezbaruah, B., Anand, J., Lahkar, M., (2014). Vancomycin-resistant enterococci: Troublemaker of the 21st century. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2, 205–212.

48. Rather, I.A., Kim, B.C., Bajpai, V.K., Park, Y.H., (2017). Self-medication and antibiotic resistance: Crisis, current challenges, and prevention. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24, 808–812.
49. Raviyameti statistika aastaraamat, (2017). *Eesti Raviamet*, lk 72.
50. Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M.H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M.J.B., Moorman, A.F.M. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*, 37(6), e45-e45.
51. Schaumann, G.E., Baumann, T., Lang, F., Vogel, H.-J., Schulz, R., Manz, W., (2015). Engineered nanoparticles in soils and waters. *Science Total Environmental*, 535, 1-1.
52. Schlich, K., Klawonn, T., Terytze, K., Hund-Rinke, K., (2013). Effects of silver nanoparticles and silver nitrate in the earthworm reproduction test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(1), 181–188.
53. Sharma, V.K., Johanson, N., Cizmas, L., McDonald, T.J., Kim, H., 2016. A review of the influence of treatment strategies on antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. *Chemosphere*, 150, 702–714.
54. Sheng, Z., Liu, Y., (2016). Effects of silver nanoparticles on wastewater biofilms. *Water research*, 45, 6039 –6050.
55. Sheng, Z., Liu, Y., (2017). Potential impacts of silver nanoparticles on bacteria in the aquatic environment. *Journal of Environmental Management*, 191, 290–296.
56. Shi, B.J., Wang, Y., Geng, Y.K., Liu, R.D., Pan, X.R., Li, W.W., Sheng, G.P., (2018). Application of membrane bioreactor for sulfamethazine-contained wastewater treatment. *Chemosphere*, 193, 840–846.
57. Smolkova, B., Dusinska, M., Gagelova, A., (2017). Nanomedicine and epigenome. Possible health risks. *Food and Chemical Toxicology*, 109, 780–796.
58. Sun, X., Sheng, Z., Liu, Y., (2013). Effects of silver nanoparticles on microbial community structure in activated sludge. *Science of the Total Environment*, 443, 828–835.
59. Zhang, C., Hu, Z., Li, P., Gajaraj,S., (2016). Governing factors affecting the impacts of silver nanoparticles on wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 572, 852–873.
60. Zhang, W., Xiao, B., Fang, T., (2018). Chemical transformation of silver nanoparticles in aquatic environments: Mechanism, morphology and toxicity. *Chemosphere*, 191, 324–334.

61. Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., Leunissen, J.A.M., (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, 35, W71-W74.
62. Vale, G., Mehennaoui, K., Cambier, S., Libralato, G., Jomini, S., Domingos, R.F., (2016). Manufactured nanoparticles in the aquatic environment-biochemical responses on freshwater organisms: A critical overview. *Aquatic Toxicology*, 170, 162–174.
63. Van Harten, R.M., Willems, R.J.L., Martin, N.I., Hendrickx, A.P.A., (2017). Multidrug-Resistant Enterococcal Infections: New Compounds, Novel Antimicrobial Therapies? *Trends in Microbiology*, 25(6), 467-479.
64. Volkmann, H., Schwartz, T., Bischoff, P., Kirchen, S., Obst, U., (2004). Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). *Journal of Microbiological Methods*, 56, 277 – 286.
65. Vymazal, J. (2014). Constructed wetlands for treatment of industrial wastewaters: A review. *Ecological Engineering*, 73, 724–751.
66. Wang, M., Zhang, D.Q., Dong, J.W., Tan, S.K., (2017). Constructed wetlands for wastewater treatment in cold climate — A review. *Journal of Environmental Sciences*, 57, 293–311.
67. Wu, H., Fan, J., Zhang, J., Ngo H.H., Guo, W., Liang, S., Hu, Z., Liu, H., (2015) (1). Strategies and techniques to enhance constructed wetland performance for sustainable wastewater treatment. *Environmental Science and Pollution Research*, 22 (19), 14637–14650.
68. Wu, H., Zhang, J., Ngo, H.H., Guo, W., Hu, Z., Liang, S., Fan, J., Liu, H., (2015) (2). A review on the sustainability of constructed wetlands for wastewater treatment: Design and operation. *Bioresource Technology*, 175, 594–601.
69. Wong, B.S.E., Hu, Q., Baeg, G.H., (2017). Epigenetic modulations in nanoparticle-mediated toxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 109, 746–752.
70. Yang, Y.F., Cheng, Y.H, Liao, C.M., (2017). Nematode-based biomarkers as critical risk indicators on assessing the impact of silver nanoparticles on soil ecosystems. *Ecological Indicators*, 75, 340–351.
71. Ye, J., Rensing, C., Su, J., Zhu, Y.G., (2017). From chemical mixtures to antibiotic resistance. *Journal of Environmental Sciences*, 62, 138–144.
72. Yilmaz, Ç., Özcengiz, G., (2017). Antibiotics: Pharmacokinetics, toxicity, resistance and multidrug efflux pumps. *Biochemical Pharmacology*, 133, 43–62.
73. 20 aastat ravimistatistikat Eestis, (2015). *Eesti Ravimiamet*, lk 57; 63.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Edith Simoniš

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„Sünteesiliste hõbeda nanoosakeste mõju vankomütsiini resistentsusgeenide arvukusele kombineeritud tehismärgalapuhasti vertikaalfiltris ja väljavoolus“

mille juhendaja on Hiie Nõlvak

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

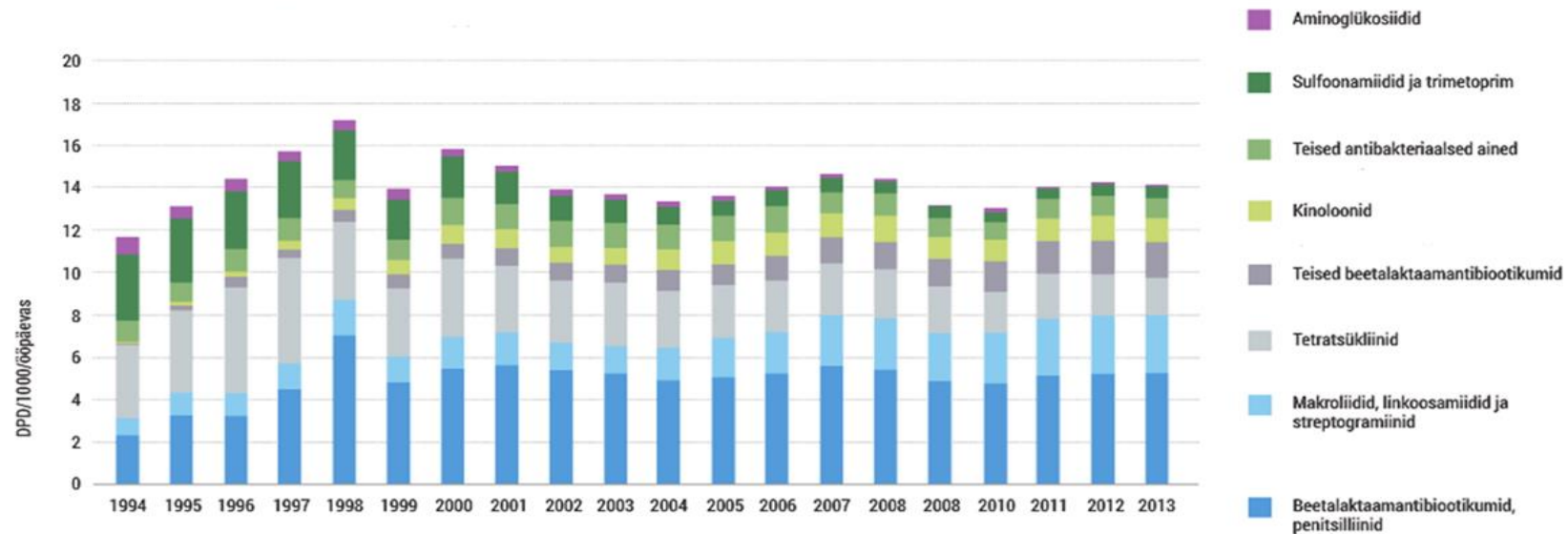
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 30.05.2018

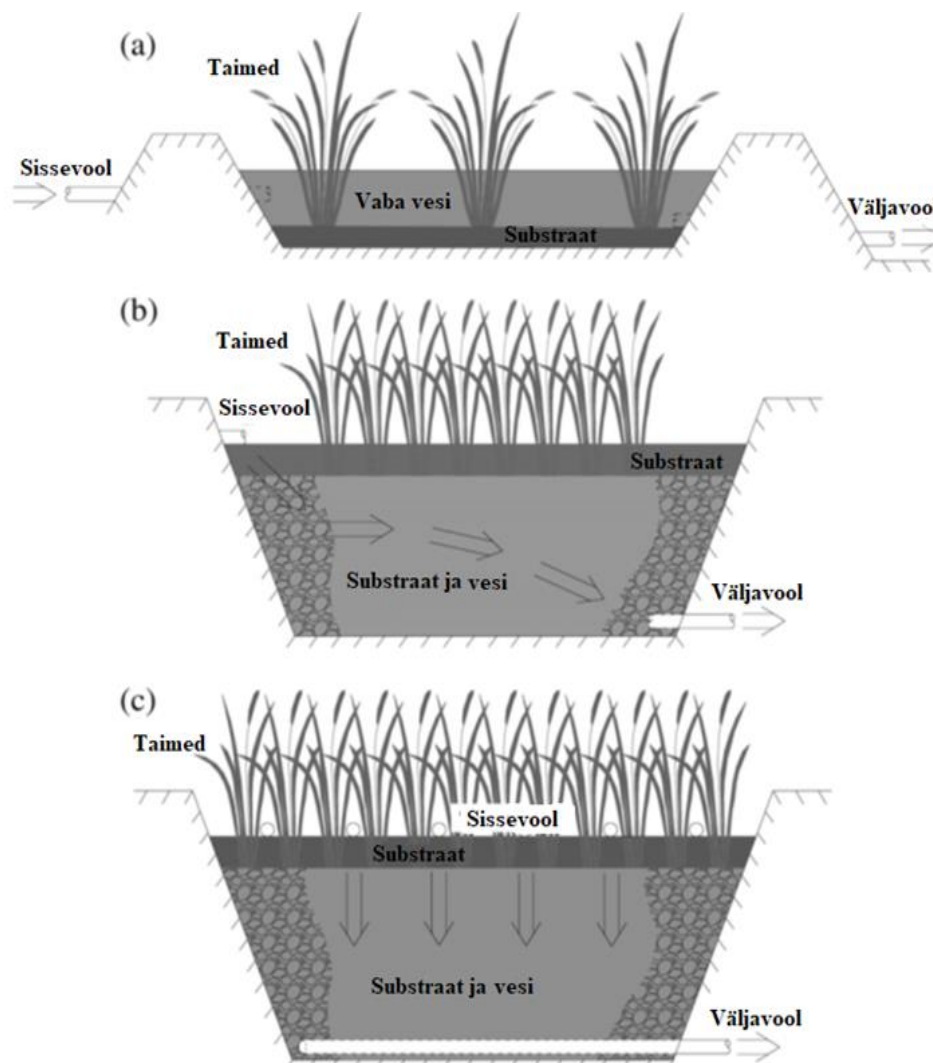
Lisad

Lisa 1. Antibiootikumide kasutamine Eestis aastatel 1994-2013 (20 aastat ravimistatistikat Eestis, 2015).

Antibiootikumide kasutamine Eestis 1994–2013



Lisa 2. Tehismärgala tüübid. a) Vabaveeline tehismärgalapuhasti, b) Horisontaalvooluline tehismärgalapuhasti, c) Vertikaalvooluline tehismärgalapuhasti (Li et al. 2014).



Lisa 3. Vankomütsiiniresistentsust kodeerivaid *vanA*, *vanC*, *vanO* geene amplifitseerivate praimerite kontsentratsioonitesti tulemused (C_T – qPCR läviväärtuse saavutamiseks kulunud amplifikatsioonitsükli arv; E – amplifikatsiooni efektiivsus).

Kontsentratsioon (μM)	<i>vanA</i>		<i>vanC</i>		<i>vanO</i>	
	C_T	E	C_T	E	C_T	E
0,4	15,15 $\pm 0,05$	1,911 $\pm 0,094$	19,36 $\pm 0,04$	1,521 $\pm 0,033$	30,72 $\pm 0,15$	1,64 \pm 0,145
0,6	14,91 $\pm 0,05$	1,836 $\pm 0,047$	17,33 $\pm 0,02$	1,768 $\pm 0,152$	28,70 $\pm 0,49$	1,706 $\pm 0,06$
0,8	14,94 $\pm 0,07$	1,849 $\pm 0,136$	16,52 $\pm 0,33$	1,728 $\pm 0,073$	26,95 $\pm 0,19$	1,759 $\pm 0,02$

Lisa 4. Vankomütsiiniresistentsust kodeerivaid *vanA*, *vanC*, *vanO* geene amplifitseerivate praimerite seondumistemperatuuri tulemused (optimaalne temperatuur on märgitud punase kastiga), (t° – seondumistemperatuur; C_T – qPCR läviväärtuse saavutamiseks kulunud amplifikatsioonitsükli arv; E – amplifikatsiooni efektiivsus).

Märklaudgeen	t ($^\circ\text{C}$)	C_T	E
<i>vanA</i>	62	16,34 \pm 0,25	1,755 \pm 0,025
	61	14,91 \pm 0,19	1,882 \pm 0,020
	60	14,91 \pm 0,05	1,836 \pm 0,047
	59	14,82 \pm 0,02	1,906 \pm 0,015
	58	14,87 \pm 0,03	1,875 \pm 0,006
	57	14,99 \pm 0,06	1,977 \pm 0,012
<i>vanC</i>	56	18,79 \pm 0,03	1,543 \pm 0,006
	55	16,52 \pm 0,33	1,728 \pm 0,073
	54	16,55 \pm 0,08	1,626 \pm 0,034
	53	16,06 \pm 0,12	1,718 \pm 0,012
	52	16,41 \pm 0,13	1,697 \pm 0,007
<i>vanO</i>	61	31,92 \pm 0,72	1,583 \pm 0,044
	60	26,95 \pm 0,19	1,759 \pm 0,02
	59	26,23 \pm 0,11	1,977 \pm 0,106
	58	27,02 \pm 0,17	1,852 \pm 0,052
	57	26,97 \pm 0,29	1,935 \pm 0,147

Lisa 5. Nõo tehismärgalapuhasti VF filtermaterjali proovide detailsed qPCR tulemused. <LOQ –alla määramispiiri ($1,2 \times 10^5$ koopiat/(g * KA)). (+ -) – süsteem tähistab vankomütsiini resistentsusgeeni tuvastamist ja mitte tuvastamist filtermaterjali proovides.

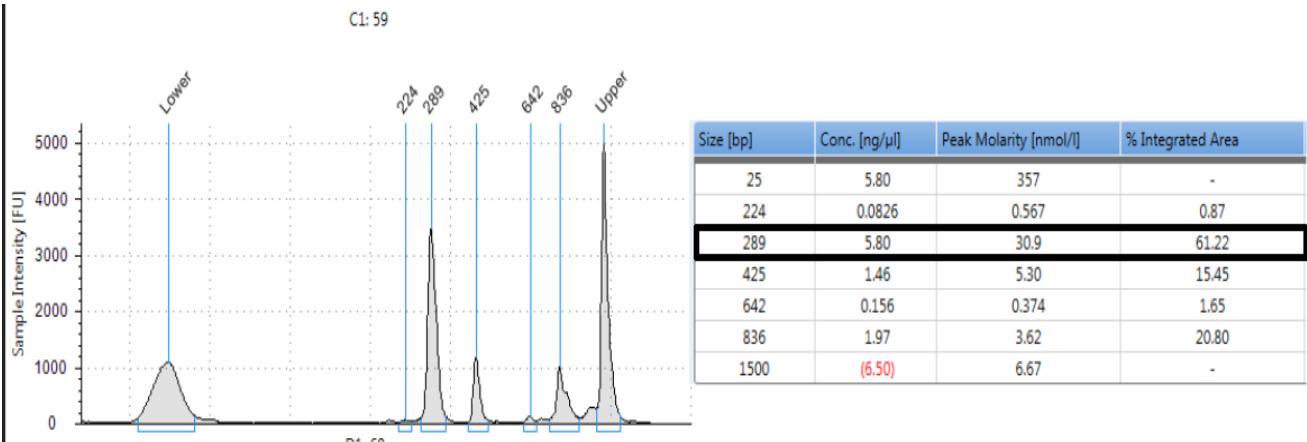
Proov	16S rRNA arvukus päev 0 (koopiat/ g *KA)	16S rRNA arvukus päev 36 (koopiat/ g * KA)	<i>VanO</i> arvukus päev 0 (koopiat/g * KA)	<i>VanO</i> arvukus päev 36 (koopiat/ g * KA)	<i>VanO</i> proportsioon (%) päev 0	<i>VanO</i> proportsioon (%) päev 36	<i>VanA</i> päev 0	<i>VanA</i> päev 36	<i>VanC</i> päev 0	<i>VanC</i> päev 36
VF1_1	$1,18 \times 10^{10}$	$4,91 \times 10^{10}$	$3,35 \times 10^5$	$1,07 \times 10^6$	0,0029	0,0022	-	+	-	-
VF1_2	$4,11 \times 10^9$	$1,17 \times 10^{10}$	$3,93 \times 10^5$	$5,86 \times 10^5$	0,0095	0,0050	-	-	-	-
VF1_3	$7,79 \times 10^9$	$3,93 \times 10^{10}$	<LOQ	<LOQ	-	-	+	-	-	-
VF2_1	$1,01 \times 10^{10}$	$2,01 \times 10^{10}$	<LOQ	$7,38 \times 10^5$	-	0,0037	-	+	-	-
VF2_2	$2,93 \times 10^9$	$8,20 \times 10^{10}$	$1,33 \times 10^6$	$9,63 \times 10^5$	0,0453	0,0117	-	-	-	-
VF2_3	$7,44 \times 10^9$	$3,81 \times 10^{10}$	$5,18 \times 10^5$	<LOQ	0,0070	-	-	-	-	-
VF3_1	$9,95 \times 10^9$	$2,72 \times 10^{10}$	$5,14 \times 10^5$	$4,33 \times 10^5$	0,0052	0,0016	-	-	-	-
VF3_2	$2,87 \times 10^9$	$4,41 \times 10^9$	<LOQ	$3,86 \times 10^5$	-	0,0093	-	-	-	-
VF3_3	$9,52 \times 10^9$	$3,96 \times 10^{10}$	<LOQ	<LOQ	-	-	-	-	-	-
VF4_1	$1,26 \times 10^{10}$	$4,86 \times 10^{10}$	<LOQ	<LOQ	-	-	-	-	-	-
VF4_2	$6,69 \times 10^9$	$4,28 \times 10^9$	<LOQ	$5,13 \times 10^5$	-	0,0120	-	-	-	-
VF4_3	$3,43 \times 10^9$	$1,88 \times 10^{10}$	<LOQ	$4,31 \times 10^5$	-	0,0023	-	-	-	-
VF5_1	$2,41 \times 10^9$	$4,48 \times 10^{10}$	<LOQ	<LOQ	-	-	-	-	-	-
VF5_2	$1,86 \times 10^9$	$8,89 \times 10^9$	<LOQ	$3,96 \times 10^5$	-	0,0045	-	-	-	-
VF5_3	$3,85 \times 10^9$	$4,83 \times 10^{10}$	<LOQ	$1,84 \times 10^6$	-	0,0038	-	-	-	-
VF6_1	$1,90 \times 10^9$	$3,20 \times 10^{10}$	<LOQ	$5,68 \times 10^5$	-	0,0018	-	-	-	+
VF6_2	$2,04 \times 10^9$	$5,24 \times 10^9$	<LOQ	$5,16 \times 10^5$	-	0,0098	-	-	-	-
VF6_3	$3,97 \times 10^9$	$9,78 \times 10^9$	$5,29 \times 10^5$	$7,71 \times 10^5$	0,0133	0,0079	-	-	-	-

Lisa 6. Nõo tehismärgalapuhasti VF veeproovide detailsed qPCR tulemused. < LOQ –alla määramispiiri ($1,6 \times 10^3$ koopiat/ ml). (+ -) – süsteem tähisstab vankomütsiini resistentsusgeeni tuvastamist või mitte tuvastamist veeproovides.

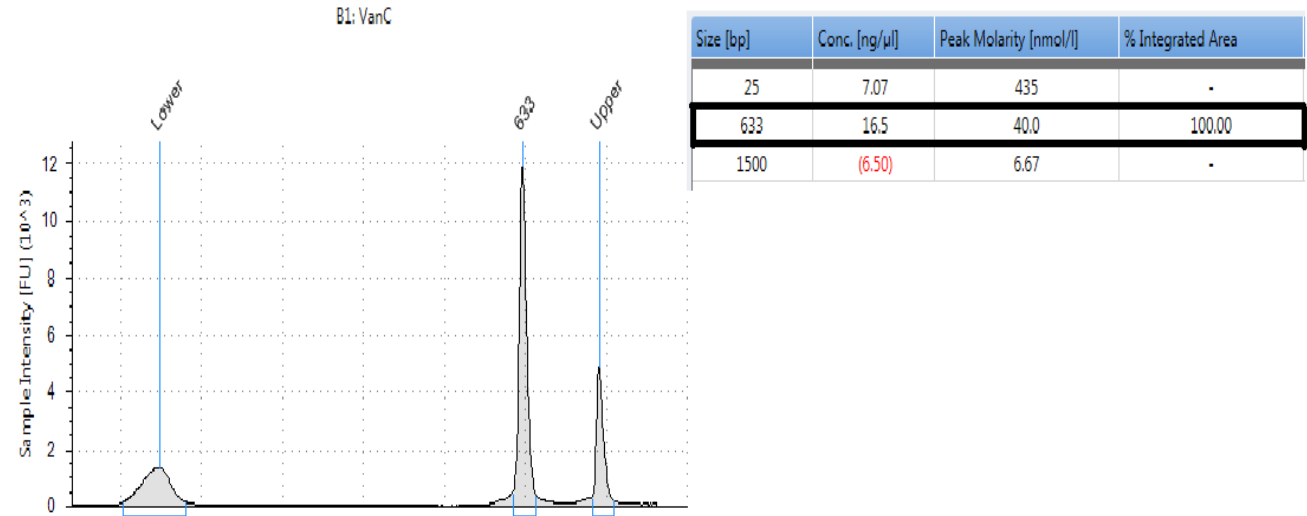
Proov	16S rRNA arvukus päev 0 (koopiat/ ml)	16S rRNA arvukus päev 36 (koopiat/ ml)	<i>VanO</i> arvukus päev 0 (koopiat/ ml)	<i>VanO</i> arvukus päev 36 (koopiat/ ml)	<i>VanO</i> proportsioon (%) päev 0	<i>VanO</i> proportsioon (%) päev 36	<i>VanA</i> päev 0	<i>VanA</i> päev 36	<i>VanC</i> päev 0	<i>VanC</i> päev 36
Sissevool	$7,65 \times 10^7$	$1,84 \times 10^8$	<LOQ	<LOQ	-	-	-	-	-	+
VF1	$6,42 \times 10^6$	$2,94 \times 10^7$	$2,00 \times 10^3$	$3,26 \times 10^3$	0,0312	0,0111	+	-	+	-
VF2	$8,41 \times 10^6$	$1,27 \times 10^7$	$2,71 \times 10^3$	$3,27 \times 10^3$	0,0323	0,0257	-	-	-	+
VF3	$6,40 \times 10^6$	$1,26 \times 10^7$	$1,96 \times 10^3$	<LOQ	0,0306	-	-	-	-	+
VF4	$1,35 \times 10^8$	$3,04 \times 10^8$	$2,55 \times 10^3$	$3,03 \times 10^3$	0,0019	0,0010	-	-	+	+
VF5	$3,53 \times 10^7$	$2,12 \times 10^8$	$2,45 \times 10^3$	$2,92 \times 10^3$	0,0069	0,0014	-	-	+	+
VF6	$4,33 \times 10^7$	$5,26 \times 10^7$	$2,13 \times 10^3$	$3,92 \times 10^3$	0,0049	0,0075	-	-	+	+

Lisa 7. Praimeripaaride amplifikatsioonispetsiifilisuse kontrolli testi tulemused. Õiged produktid on märgitud musta kastiga.

A: *VanO*



B: *VanC*



C: *VanA*

